

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 07143887
PUBLICATION DATE : 06-06-95

APPLICATION DATE : 28-06-94
APPLICATION NUMBER : 06146827

APPLICANT : MITSUI GYOSAI SHOKUBUTSU BIO
KENKYUSHO:KK;

INVENTOR : ICHIKAWA NORIO;

INT.CL. : C12N 15/09 A01H 5/00 // C12N 5/10
C12N 9/00

TITLE : ACETYL COA CARBOXYLASE GENE
OF PLANT

TATCCGGTGA TATTAAGGC 20

I

TATCCGGTCA TATTAAGGC 20

II

TATCCGGTGA TATCAAGC 20

III

TATCCGGTGA TATCAAGGC 20

IV

TATCCGGTGA TATAAAGC 20

V

TATCCGGTCA TATAAAGGC 20

VI

CATTTCAGTG ACNCGATGTT C 21

VII

CATTTCAGTG ACNCGGTCCT C 21

VIII

CATTTCAGTG ACNCGATGCT C 21

IX

CATTTCAGTG ACNCGGTCCT C 21

X

ABSTRACT : PURPOSE: To provide a new gene fragment useful for the breeding of a desired plant from the viewpoint of the fat synthesis and the protein synthesis of the plant.

CONSTITUTION: The gene fragment coding a part of acetyl CoA carboxylase is produced by the polymerase chain reaction using a genom DNA or cDNA of a plant as a template and using one kind of oligomers of formula I to formula IV and one kind of oligomers of formula VII to formula X as primers. Preferably, the genom DNA or cDNA of Arabidopsis thaliana is used as the template.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-143887

(43) 公開日 平成7年(1995)6月6日

(5) IntCl.⁹

識別記号

庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

C 1 2 N 15/09

Z N A

A 0 1 H 5/00

A 8502-2B

// C 1 2 N 5/10

9050-4B

C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

8412-4B

5/ 00

C

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-146827

(22) 出願日 平成6年(1994)6月28日

(31) 優先権主張番号 特願平5-203477

(32) 優先日 平5(1993)8月17日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年3月31日、
社団法人日本農芸化学会発行の、「日本農芸化学会誌稿
演要旨集」に発表

(71) 出願人 591068458

株式会社三井薬理植物バイオ研究所
東京都港区赤坂2-5-27 八千代ビル4
F

(72) 発明者 柳井 幸弘

茨城県つくば市東新井10-1 スカイノブ
ル-211号

(72) 発明者 島田 浩章

千葉県茂原市東郷225-1 三井東庄富士
見アパート11号

(72) 発明者 市川 範夫

茨城県土浦市富士崎1-1-13 ダイヤバ
レス土浦406号

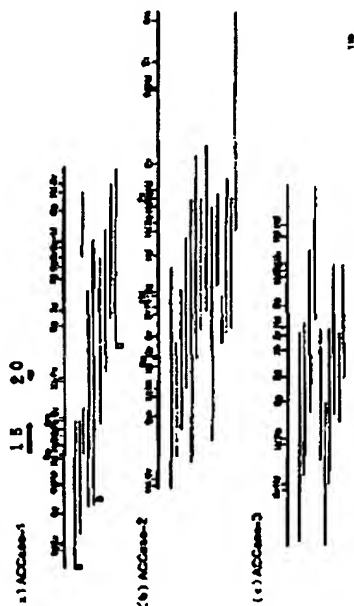
(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外3名)

(54) 【発明の名称】 植物のアセチルCoAカルボキシラーゼ遺伝子

(57) 【要約】

【目的】 植物のアセチルCoAカルボキシラーゼ遺伝子を提供する。

【構成】 各種生物の既知のアセチルCoAカルボキシラーゼ間で類似性のあるアミノ酸配列に相当するオリゴヌクレオチドをプライマーとし植物ゲノムDNAを鋳型とするポリメラーゼ連鎖反応を行い、アセチルCoAカルボキシラーゼの一部をコードする遺伝子断片を得、これをプローブとするハイブリダイゼーションにより植物ゲノムライブラリーからアセチルCoAカルボキシラーゼ遺伝子全長を得る。さらに、前記ゲノム遺伝子の一部をプローブとして用い、アセチルCoAカルボキシラーゼcDNAクローンを得る。



(2)

特開平7-143887

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物のゲノムDNAあるいはcDNAを断片とするポリメラーゼ連鎖反応で増幅されるDNA断片において、

前記ポリメラーゼ連鎖反応に、配列表の配列番号1～6に示すオリゴヌクレオチドから選ばれる1種と、配列表の配列番号11～14に示すオリゴヌクレオチドから選ばれる1種とをプライマーに用いることにより得られることを特徴とするアセチルCoAカルボキシラーゼの一部をコードする遺伝子断片。

【請求項2】 前記植物がアブラナ科植物であることを特徴とする請求項1記載の遺伝子断片。

【請求項3】 配列表の配列番号15に示すヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項2記載の遺伝子断片。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子断片をプローブに用いるハイブリダイゼーションにより植物遺伝子ライブラリーから選択されるアセチルCoAカルボキシラーゼ全アミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項5】 前記植物がアブラナ科植物であることを特徴とする請求項4に記載の遺伝子。

【請求項6】 大腸菌FERM P-13792株、大腸菌FERM P-13793株及び大腸菌FERM P-13794株に各々保持されるシロイヌナズナのゲノムクローンpATgACC-1a、pATgACC-1b及びpATgACC-1cに含まれる配列を有することを特徴とする請求項5記載の遺伝子。

【請求項7】 前記アブラナ科植物がシロイヌナズナであり、図2(b)に示す物理的地図を有することを特徴とする請求項5記載の遺伝子。

【請求項8】 前記アブラナ科植物がシロイヌナズナであり、図2(c)に示す物理的地図を有することを特徴とする請求項5記載の遺伝子。

【請求項9】 請求項4記載の遺伝子の全部又は一部をプローブに用いるハイブリダイゼーションにより植物遺伝子ライブラリーから選択されるアセチルCoAカルボキシラーゼ全アミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項10】 前記植物がアブラナであり、図6(a)又は(b)に示す物理的地図を有することを特徴とする請求項9記載の遺伝子。

【請求項11】 配列表の配列番号22に示すアミノ酸配列を有するアセチルCoAカルボキシラーゼをコードするDNA断片。

【請求項12】 配列表の配列番号21において、ヌクレオチド番号408～7169で表される配列を有する請求項11記載のDNA断片。

【請求項13】 請求項1～3に記載の遺伝子断片、請求項4～10に記載の遺伝子及び請求項11または12記載のDNA断片のいずれかの少なくとも一部を植物に

導入することによって、アセチルCoAカルボキシラーゼの発現量に変化がもたらされた形質転換植物体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、植物のアセチルCoAカルボキシラーゼ遺伝子に関し、詳しくは、植物の貯蔵物質の生合成を制御している因子の一つであるアセチルCoAカルボキシラーゼをコードするDNA断片に関する。

【0002】

【従来の技術】 アセチルCoAカルボキシラーゼ（以下、「ACCase」という）は、脂肪合成の律速酵素と考えられており、様々な生物において存在が確認されている。この酵素は、アセチルCoAのアセチル基にCO₂を結合させて、マロニルCoAを合成する反応を触媒する。大腸菌では、ACCaseは、4種の独立したポリペプチドの集合体として構成され、ポリペプチドそれぞれが、ピオチンカルボキシラーゼ、ピオチンカルボキシルキャリアープロテイン、トランスカルボキシラーゼのいずれかの異なる活性を有している（S. J. Li & J. E. Cronan Jr., J. Biol. Chem., 267, 16841-16847 (1992)）。

【0003】 一方、動物や酵母および植物のACCaseでは、分子量22万～24万の大きな1つのポリペプチドに、3つの活性ドメインが含まれていることが知られている（コーン・スタンプ生化学、第5版、東京化学同人（1988）、M. A. Egli et al., Plant Physiology, 101, 499-506(1993)）。

【0004】 植物のACCaseは、分子量22万～24万の大きな多機能性のポリペプチドの二量体であり、色素体に存在するとされている。しかし、その特異な性状のために、ACCaseの酵素蛋白質を精製し、構造ならびに生化学的特性の分析を行なうことは、極めて困難であった。これまでに、その酵素蛋白質の精製が報告されたのは、アブラナ、ダイズおよびトウモロコシなどの数例にすぎない（A. R. Slabas & A. Helliier, Plant Sci., 39, 177-182(1985); D. J. Charles & J. H. Cherry, Phytochemistry, 25, 1067-1071(1986); M. A. Egli et al., Plant Physiology, 101, 499-506(1993)）。

【0005】 従って、蛋白質情報に基づく植物のACCaseの遺伝子に関する研究は余り進んでいない。最近、ニンジンとダイズで、ACCase遺伝子の単離が進められていることが報告された（B. J. Nikolau & E. A. Wurtele, In US-JAPAN BILATERAL SEMINAR-BIOCHEMICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL ASPECTS OF MEMBRANE AND STORAGE LIPIDS OF PLANTS (1992)）。しかしながら、その解析ならびに特徴付けがなされるには、未だ至っていない。

【0006】 他方、動物や微生物では、ACCaseに関する生化学的、遺伝学的研究が、比較的進展してい

(3)

特開平7-143887

3

る。それらの知見を基にした解析によって、ACCaseをコードする全塩基配列が、「ラット」、「ニワトリ」、「酵母」および「大腸菌」で明らかになっている(F. Lopez-Casillas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5784-5788(1988), T. Takai et al., J. Biol. Chem., 263, 2651-2657(1988), W. Al-Feel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4534-4538(1992), H. Kondo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9730-9733(1991), S. J. Li & J. E. Cronan Jr., J. Biol. Chem., 267, 855-863(1992), S. Muramatsu & T. Mizuno, Nucleic Acids Res., 17, 3982(1989), S. J. Li & J. E. Cronan Jr., J. Biol. Chem., 267, 16841-16847(1992))。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】アセチルCoAは脂肪合成の出発点であり、ACCaseの触媒反応でマロニルCoAに変換され、このマロニルCoAが基質となって、脂肪酸合成酵素により脂肪酸が生成される。更に脂肪酸は、いくつかの酵素反応を経て、貯蔵脂肪であるトリアシルグリセロールの構成成分となる。

【0008】また、アセチルCoAは、オキサロ酢酸との縮合によって、クエン酸を生成する。このクエン酸は、TCAサイクルと呼ばれる一連の酵素反応でオキサロ酢酸にまで戻る。TCAサイクルに入った代謝物は、最終的にはエネルギーとして消費されるか、アミノ酸合成系へつながり、更には蛋白質となる。すなわち、アセチルCoAは、脂肪合成と蛋白質合成の分岐点に存在する。

【0009】したがって、ACCaseの活性が相対的に強い場合、クエン酸の生成量が相対的に低下し、蛋白質合成が抑えられ、脂肪合成が促進されることが予測される。

【0010】種子に貯蔵される脂肪の含量と蛋白質の含量が負の相関性を示すことは、ダイズで報告されている(T. Sugimoto et al., Agri. Biol. Chem., 53, 885-887(1989))。そこで、植物のACCase活性を人為的に操作することによって、脂肪合成と蛋白質合成の比率(分配の割合)を変えられるかに興味を持たれるところである。

【0011】油料作物として利用されるアブラナ、ダイズ、ゴマ、ワタ、トウモロコシ、ヒマワリ、ラッカセイ、ペニバナその他の植物では、その脂肪含量の増大が、育種的に重要な課題である。また、ダイズの場合、逆にその蛋白質含量の増大も重要な育種課題である。しかしながら、従来の育種法では、このような形質の改良を行うのに長い年月と多大な労力を要する。そこで、遺伝子操作を用いた分子育種的手法による形質の改良が待たれていた。

【0012】食糧の増産は、世界的な急務であるが、新

4

地面積の拡大は、自然破壊にもつながり、好ましくない。このような条件下で、食糧の増産を図るには、植物における特定の成分濃度を高める方法が考えられる。

【0013】本発明は、かかる観点からなされたものであり、上記要望を遺伝子工学的手法を利用して解決しようとするものである。特に、脂肪と蛋白質の増産を図る観点から所望する植物を育種することを目的とし、脂肪と蛋白質の合成に関わる遺伝子をクローニングすることを課題とする。

10 【0014】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、光合成で作られる炭水化物が、貯蔵物質の蛋白質あるいは脂肪に変換される際の分岐点に働く酵素であるACCaseの遺伝子を単離を試み、シロイヌナズナ(アラビドプシス サリアナ: *Arabidopsis thaliana*) からACCase遺伝子を単離することに成功し、更に油料作物であるアブラナのACCase遺伝子のクローニングにも成功し、本発明に至った。

20 【0015】すなわち本発明は、植物のゲノムDNAあるいはcDNAを鋳型とするポリメラーゼ連鎖反応で増幅されるDNA断片において、前記ポリメラーゼ連鎖反応に、配列表の配列番号1~6に示すオリゴヌクレオチドから選ばれる1種と、配列表の配列番号11~14に示すオリゴヌクレオチドから選ばれる1種とをプライマーに用いることにより得られることを特徴とするアセチルCoAカルボキシラーゼの一部をコードする遺伝子断片、及びこの遺伝子断片をプローブに用いるハイブリダイゼーションにより植物遺伝子ライブラリーから選択されるアセチルCoAカルボキシラーゼ全アミノ酸配列をコードする遺伝子である。

30 【0016】また本発明は、配列表の配列番号22に示すアミノ酸配列を有するアセチルCoAカルボキシラーゼをコードするDNA断片、及び配列表の配列番号21において、ヌクレオチド番号408~7169で表される配列を有するDNA断片を提供する。

40 【0017】さらに本発明は、前記遺伝子断片、遺伝子またはDNA断片を導入することによってアセチルCoAカルボキシラーゼの発現量に変化がもたらされた形質転換植物体を提供する。

【0018】以下、本発明を詳細に説明する。

【0019】<1>植物のACCaseの一部をコードするDNA断片

ある特定のDNA配列を得る手段として、ポリメラーゼ連鎖反応、いわゆるポリメラーゼチェーンリアクション(polymerase chain reaction)法が知られている。この方法は、

①二本鎖DNAの一本鎖DNAへの熱変性、

②上記DNAの内部に存在する領域の両端の配列に相当する2種類のオリゴヌクレオチドプライマーと、前記熱

(4)

特開平7-143887

5

変性DNAとのアニーリング、

③前記オリゴヌクレオチドをプライマーとしたポリメラーゼ反応、

からなる増幅サイクルを繰り返すことにより、上記領域を増幅する手段である。

【0020】このように、ポリメラーゼ連鎖反応によりDNA配列を増幅させるには、少なくとも部分的に配列を知る必要がある。ところで、植物のACCase遺伝子の構造は、これまでに全く報告がないが、動物や微生物のACCase遺伝子とある程度の類似性を示す部分を内包すると推測された。そこで、既に報告のある「ラット」、「ニワトリ」、「酵母」および「大腸菌」のそれぞれのACCase遺伝子がコードするアミノ酸配列を比較したところ、これらの中で類似性の認められる領域を見だし、3カ所の領域を「 α 」、「 β 」および「 γ 」と名付けた。これら4種類のACCase遺伝子の各領域のDNA配列の比較を図1に示す。尚、アミノ酸配列の先端に付した数字は、それぞれの生物のACCaseにおける開始メチオニンから数えたアミノ酸の番号である。

【0021】これらの各領域中の部分アミノ酸配列から予想されるオリゴヌクレオチドを合成し、これをポリメラーゼ連鎖反応のプライマーとして用い、ACCase遺伝子を単離することを試みた。プライマーは、「 α 」の領域から6種類（ $\alpha 1 \sim \alpha 6$ ：各々順に配列番号1～6に配列を示す）、「 β 」の領域配列から4種類（ $\beta 1 \sim \beta 4$ ：配列番号7～10）、「 γ 」の領域から4種類（ $\gamma 1 \sim \gamma 4$ ：配列番号11～14）各々作製した。本発明のACCaseを得るためには、プライマーは上記のものに限定されず、ACCaseによく保存されている領域、すなわち各種生物において類似性の高い領域に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドを用いることができる。

【0022】後記実施例に示すように、 $\alpha 3$ と $\gamma 4$ のプライマーを組み合わせたポリメラーゼ連鎖反応により得られたDNA断片の塩基配列を決定し、既知のACCase遺伝子との比較解析を行なうことにより、927bpの増幅断片が、シロイヌナズナのACCase遺伝子の一部であることを明らかにした。このDNA断片の配列を、配列番号15に示す。

【0023】＜2＞ACCase遺伝子

上記のようにして得られるDNA断片は、プライマーに相当する領域間に限られるので、得られる断片はACCaseの一部をコードするDNAである。したがって、より長いDNA断片を得たい場合には、これをプローブとするハイブリダイゼーションを行うことにより、ゲノムライブラリーあるいはcDNAライブラリーから得ることができる。また、ACCaseは分子量が大きいので、単一のクローンでACCase遺伝子全体をカバーできない場合には、染色体歩行を繰り返すことにより、

6

酵素をコードする領域全体をカバーする複数のDNA断片として得ることができる。

【0024】クローン化されたDNA断片の塩基配列の決定は、Maxam-Gilbert法あるいは、ダイデオキシ法により行う。ダイデオキシ法による塩基配列の決定は、市販されているキットを用いて行うことができ、配列決定を自動的に行うオートシーケンサーを使用してもよい。

【0025】後記実施例に示すように、シロイヌナズナのACCaseをカバーする3種のDNA断片が得られた。これらは各々ラムダファージベクターにクローン化された後、プラスミドベクターに変換されており、各プラスミドDNAを保持する大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-13792、FERM P-13793、FERM P-13794として寄託されている。

【0026】さらに、このようにして得られたシロイヌナズナのACCase遺伝子の一部をコードするDNA断片あるいはACCase遺伝子全体をプローブに用いたハイブリダイゼーション等により、他の植物のDNAライブラリーを検索することによって、他の植物のACCaseをコードする塩基配列を含むcDNA断片もしくはゲノムDNA断片を単離することが可能となる。他の植物としては、油料作物であるアブラナ、ダイズ、ゴマ、ワタ、トウモロコシ、ヒマワリ、ラッカセイ、ペニバナ等が挙げられる。

【0027】後記実施例に示すように、シロイヌナズナのACCase遺伝子の一部をコードするDNA断片をプローブとして、シロイヌナズナのACCase遺伝子を含む3種のクローンを得た。さらに、その内の1つをプローブとしてアブラナのACCase遺伝子を含むゲノムクローンの単離に成功した。これらのクローンは、ACCase酵素蛋白質をコードする配列と、この遺伝子の植物細胞内での発現制御に関与するプロモーター配列とを含んでいると予想された。

【0028】＜3＞ACCaseをコードするcDNA断片

ACCaseをコードするcDNA断片は、上記と同様に、mRNA断片を鋳型とするポリメラーゼチェーンリアクション法によって増幅することにより、あるいは上記で得られたACCase遺伝子またはその断片をプローブとするハイブリダイゼーションによりcDNAライブラリーから選択することによって、得られる。

【0029】cDNAライブラリーは、シロイヌナズナ等の植物の茎葉等からmRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、ポリメラーゼ反応によって2本鎖化したものをベクターに挿入し、大腸菌等に形質転換することにより作製することができる。cDNAクローニングキットが市販されているのでこれらを使用して

(5)

特開平7-143887

7

【0030】得られたcDNAライブラリーから、上記で得られたACCase遺伝子またはその断片をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行うことによって、ACCaseをコードするcDNA断片を有するベクターを保持する形質転換体を得られ、さらに、この形質転換体からベクターを回収すれば、ACCaseをコードするcDNA断片が得られる。また、cDNAライブラリーからライブラリーDNAを調製し、これを鋳型とするポリメラーゼチェインリアクション法によってACCaseをコードするcDNA断片を増幅してもよい。

【0031】ライブラリーの作製に用いるベクターは、多数種市販されており、これらを使用することができる。DNAの切断、連結、形質転換、遺伝子の塩基配列の決定、ハイブリダイゼーション等一般の遺伝子組換えに必要な方法は、各操作に使用する市販の酵素等に添付されている説明書や、Molecular cloning (Maniatis T. et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載されている。

【0032】このようにして、後記実施例で得られたACCaseをコードするcDNA断片のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号21に、アミノ酸配列のみを配列番号22に示す。

【0033】＜4＞ACCase遺伝子を導入された形質転換植物
準備されたACCase遺伝子（以下、本項においてはACCaseをコードするcDNA断片でもよい）を加えて作出されるセンス・ACCase遺伝子あるいはアンチセンス・ACCase遺伝子を植物に導入することにより、植物体内でのACCaseの発現を増大あるいは抑制することができる。

【0034】センス・ACCase遺伝子は、ACCase遺伝子をカラフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターなど植物で発現可能なプロモーターと結合し、これを植物細胞に導入することによって発現させることができる。

【0035】また、アンチセンスACCase遺伝子は、ACCase遺伝子の全部又は一部を、逆方向にプロモーターに結合し、これで植物細胞を形質転換することによって発現させることができる。

【0036】本明細書においては、「ACCase遺伝子」とは、ACCaseをコードする構造遺伝子のみでなく、センス・ACCase遺伝子あるいはアンチセンス・ACCase遺伝子をいうことがある。

【0037】上記遺伝子で植物を形質転換するには、上記遺伝子をプラスミドに挿入したものを、エレクトロポレーション（電氣的穿孔法）あるいはアグロバクテリウムのT1プラスミドを利用する方法などによって、植物細胞プロトプラストに導入することによって行うことができる。

8

【0038】このような植物としては、アブラナ、ダイズ、ゴマ、ワタ、トウモロコシ、ヒマワリ、ラッカセイ、バナナなど脂肪生産に利用されている多くの植物が挙げられる。また、脂肪生産能の優れたイソクリシス（*Isochrysis*）、パブロバ（*Pavlov*）、クリプトモナス（*Cryptomonas*）、クリコスフェラ（*Cricosphaera*）、ケトセロス（*Chaetoceros*）などの微細藻類も挙げられる。特に、シロイヌナズナおよびアブラナの属するアブラナ科植物は、良質脂肪の生産能が高い有用作物を含んでおり、広く生産されている。本発明のACCase遺伝子を用いる分子育種的手法によって、脂肪成分を増大させることは、非常に高い経済効果が期待される。

【0039】更に、本発明によって得られるACCase遺伝子は、その一部を特異的に変異させて、ACCaseの人工的改変に利用することが可能である。これは、ACCaseの機能向上を求める研究に用いることができる。また、同時に酵素蛋白質の機能発現に関する幅広い研究にも用いることができる。

【0040】以上の操作に際し、DNAの切断、連結、形質転換、遺伝子の塩基配列の決定、ハイブリダイゼーション等一般の遺伝子組換えに必要な方法は、各操作に使用する市販の酵素等に添付されている説明書や、Molecular cloning (Maniatis T. et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press)、あるいはCurrent Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編集、John Wiley & Sons, Inc., 1987)に記載されている。

【0041】このようにしてセンス・ACCase遺伝子及びアンチセンス・ACCase遺伝子で形質転換したシロイヌナズナは、株式会社三井物産植物バイオ研究所（茨城県つくば市千現 2-1-6 つくば研究支援センターA-10）にて保管栽培されており、本出願人は、本件発明の確認のため役立て得ることを宣言する。

【0042】

【実施例】以下に、本発明を実施例に基づき詳細に説明する。操作の手順は特に記述しない限り、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編集、John Wiley & Sons, Inc., 1987)に記載されている方法に従った。

【0043】

【実施例1】シロイヌナズナACCase遺伝子の単離及びその発現

(1) シロイヌナズナACCase遺伝子断片のポリメラーゼ連鎖反応による増幅

既に報告のある「ラット」、「ニワトリ」、「酵母」および「大腸菌」のそれぞれのACCase遺伝子がコードするアミノ酸配列を比較し、それらの間で共通した類似性が認められるアミノ酸配列の中から、ACCaseのピオチンカルボキシラーゼ・ドメイン内の3ヶ所の領域

(6)

特開平7-143887

10

域を選び出し、各々「 α 」、「 β 」および「 γ 」と名付けた(図1)。

【0044】次に、「 α 」のアミノ酸配列を基に6種類のオリゴヌクレオチドプライマー $\alpha 1 \sim \alpha 6$ (配列表の配列番号1~6)を、「 β 」のアミノ酸配列を基に4種類のオリゴヌクレオチドプライマー $\beta 1 \sim \beta 4$ (配列表の配列番号7~10)を、「 γ 」のアミノ酸配列を基に4種類のオリゴヌクレオチドプライマー $\gamma 1 \sim \gamma 4$ (配列表の配列番号11~14)を作製した。

【0045】これら $\alpha 1 \sim \alpha 6$ のオリゴヌクレオチドプライマーと $\gamma 1 \sim \gamma 4$ のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせた24とおりのポリメラーゼ連鎖反応、ならびに $\beta 1 \sim \beta 4$ のオリゴヌクレオチドプライマーと $\gamma 1 \sim \gamma 4$ のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせた16とおりのポリメラーゼ連鎖反応をシロイヌナズナの全DNAを鋳型に用いて行った。

【0046】増幅反応の条件は以下の通りである。すなわち、シロイヌナズナの全DNA 40 ng、2種類のオリゴヌクレオチドプライマー各40 pmol、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、100 mM dNTP、0.4単位のDNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer Cetus社製 AmpliTaq DNA polymerase)を含む10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 40 μ lに15 μ lのミネラルオイルを重層し、市販の装置(Perkin-Elmer Cetus社製 thermal cycler)を用いて増幅反応を行った。

【0047】90℃で10分加熱してDNAを変成させた後、DNAの変性(94℃1分)、アニーリング(55℃2分)、ポリメラーゼ反応(72℃3分間)からなるサイクルを、30回繰り返し、複数の増幅断片を得た。

【0048】これらの増幅断片それぞれについて、プラスミド Bluescript SK+にクローニングした後に、塩基配列を決定し、既知のACCase遺伝子との比較を行った。その結果、配列表の配列番号3に示す $\alpha 3$ と配列表の配列番号14に示す $\gamma 4$ のプライマーを組み合わせたポリメラーゼ連鎖反応で増幅された927 bpの断片が、動物のACCaseと60%の相同性を示すアミノ酸配列をコードし得る塩基配列を含み、シロイヌナズナACCase遺伝子の一部であることが明らかとなった。

【0049】この927 bpの遺伝子断片の塩基配列を配列表の配列番号15に示した。同遺伝子断片においては、酵素蛋白質のアミノ酸をコードする塩基配列が、4ヶ所のイントロンによって分断されていた。

【0050】一方、 $\beta 1 \sim \beta 4$ と $\gamma 1 \sim \gamma 4$ のプライマーを組み合わせたポリメラーゼ連鎖反応では、遺伝子断片の増幅が見られなかった。これは、上記イントロンの1つが、「 β 」領域をコードする塩基配列を分断していたために、 $\beta 1 \sim \beta 4$ のオリゴヌクレオチドがポリメラーゼ連鎖反応のプライマーとして機能しなかったため

あることがわかった。

【0051】(2)シロイヌナズナのゲノムDNAの調製とゲノムライブラリーの構築

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のゲノムDNAは、RogersとBendichの方法(Plant Mol. Biol., 5, 69 (1985))に従って調製した。得られたゲノムDNAを物理的に寸断し、更にショ糖密度勾配遠心分離を行なって、1~10 kbのDNA断片を得た。

【0052】このDNA断片の両末端に、ライゲーションキット(宝酒造社製)を用いてEcoRIアダプターを連結した。これをEcoRIで切断した λ ZAP IIファージベクターのアームと連結した後、インビトロパッケージングキット(ストラタジーン社製、Gigapack II Gold)を用いて、ラムダファージのパッケージングを行ない、大腸菌XL1-Blue株に感染させることによって、多数の組換え入ファージを得た。これをシロイヌナズナのゲノムDNAライブラリーとした。ライブラリーの大きさは、 2×10^6 であった。

【0053】(3)シロイヌナズナACCase遺伝子のゲノムクローニングの準備

前記シロイヌナズナのゲノムライブラリーを対象に、シロイヌナズナACCase遺伝子を含むゲノムクローンを、前述のシロイヌナズナのACCase遺伝子の一部である927 bpの増幅断片をプローブとして用いたブラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングを行なった。

【0054】その結果、複数の陽性を示すゲノムクローンを得た。それぞれのクローンは、ヘルパーファージを感染させて、プラスミドに変換した。6種の制限酵素(BamHI, BglII, EcoRV, HindIII, PstI, XbaI)を用いて、ゲノムクローンの挿入断片の物理的地図を作成し、それぞれのクローンの対応関係を調査した。ゲノムクローンは、3群に分割され、これらが染色体中の3つの部位に由来していることが確認された。そこで、これら3つの部位に含まれるACCase遺伝子をそれぞれACCase-1, ACCase-2, ACCase-3と名付けた。また、プローブとしたACCase遺伝子の一部である927 bpの増幅断片は、ACCase-1に由来していることを確認した。

【0055】更に、得られたACCase-1のゲノムクローンの下流側部分をプローブに用いて、染色体歩行を繰り返すことによって、新たにゲノムクローンを単離し、ACCase-1, ACCase-2, ACCase-3それぞれの遺伝子全体をゲノムクローンでカバーするに至った。各ACCase遺伝子の物理的地図を図2に示す。

【0056】図2中、物理的地図中の制限酵素切断点は、BamHI (Bm), BglII (Bg), EcoR

(7)

特開平7-143887

11

V (E v), Hind III (Hid), Pst I (P s), Xba I (X b) で示した。配列表の配列番号15および後述の配列表の配列番号20に示した塩基配列は、それぞれACCase-1の物理的地図の上段の「15」および「20」を付した太線で示される領域に由来する。各物理的地図の下段の細線は、単離された個々のゲノムクローンがカバーする領域を示している。

【0067】また、a, b, cを付した細線は、上記のヘルパーファージの感染によりプラスミドに変換されたゲノムクローンのうちの3クローン、pATgACC-1a, pATgACC-1b, pATgACC-1cがカバーする領域である。これらのプラスミドを保持する大腸菌XL1-Blueは、工業技術院生命工学工業技術研究所に、各々順にFERM P-13792, FERM P-13793, FERM P-13794として寄託されている。

【0068】(4) シロイヌナズナACCase-1遺伝子におけるピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメインのコード域の検出

「ラット」、「ニワトリ」、および「酵母」のACCase遺伝子においては、ピオチンカルボキシル・ドメインをコードする領域の下流に、ピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメインのコード域が位置している。シロイヌナズナのACCase遺伝子においても、ピオチンカルボキシル・ドメインをコードする領域の下流に位置すると推測されるピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメインのコード域の検出を行なった。

【0069】既に報告のある「ラット」、「ニワトリ」、「酵母」および「大腸菌」のそれぞれのACCase遺伝子がコードするピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメインのアミノ酸配列を比較し、それらの間で共通した類似性が認められるアミノ酸配列を選び出し、「BCCP」と名付けた(図3)。図3において、アミノ酸配列の先頭に付した数字は、それぞれの生物のACCaseにおける開始メチオニンから数えたアミノ酸の番号である。

【0060】次に、「BCCP」のアミノ酸配列を基に4種類のオリゴヌクレオチドプライマーBCCP1~BCCP4(配列表の配列番号16~19)を作製した。それらBCCP1~BCCP4のオリゴヌクレオチドプライマーと、シロイヌナズナACCase-1遺伝子のピオチンカルボキシル・ドメインをコードする領域に対応した前述のα3のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせた4とおりのポリメラーゼ連鎖反応を、前記と同様の条件でシロイヌナズナのACCase-1遺伝子のゲノムクローンを鋳型に用いて施した。

【0061】その結果、BCCP2とα3、およびBCCP3とα3のプライマーの組み合わせにおいて、3kbの増幅断片が得られ、ピオチンカルボキシル・ド

12

メイン内の「α」の領域をコードする塩基配列の下流3kbにピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメインをコードする領域があることが示唆された。

【0062】実際に、このピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメインのコード域が存在すると考えられた領域のゲノムクローンの塩基配列を分析したところ、1ヶ所のイントロンによって分断される形で、ピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメインのアミノ酸配列をコードし得る塩基配列(配列表の配列番号20)を見出すことができた。

【0063】以上の結果は、本発明の遺伝子がACCaseをコードする遺伝子であることを裏付けている。

【0064】(5) シロイヌナズナACCase-1遺伝子のRFLPマッピング

前述のシロイヌナズナのACCase-1遺伝子の一部に由来する927bpの増幅断片をプローブとして用いて、シロイヌナズナのコロニア株ならびにランズバーグ株のゲノムDNAとのサザンハイブリダイゼーションを行なった。ACCase-1遺伝子のハイブリダイゼーションバンドは、シグナル強度の差異によって、ACCase-2遺伝子およびACCase-3遺伝子のバンドと明確に区別された。また、制限酵素BamHIによるゲノムDNA分解物に対するACCase-1遺伝子のハイブリダイゼーションバンドは、コロニア株とランズバーグ株の間でRFLP(restriction fragment length polymorphism)を示した(図4)。

【0065】このRFLPを用いれば、シロイヌナズナにおいて既に作成されているRFLP地図との対応付けにより、ACCase-1遺伝子の染色体上での座位の決定が可能である。シロイヌナズナのコロニア株とランズバーグ株の交配後代のゲノムDNAを材料にして、ACCase-1遺伝子に由来する927bpの増幅断片と、既に座位の決定されているRFLPマーカーとをプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションを行ない、組み換え価を算出してACCase-1遺伝子座の決定を行なった。解析の結果、ACCase-1遺伝子は、シロイヌナズナの第1染色体の中央部に位置付けられた(図5)。

【0066】(6) アブラナのゲノムDNAの調製とゲノムライブラリーの構築

アブラナ(ブラシカ ナプス: Brassica napus)のゲノムDNAは、RogersとBendichの方法(Plant Mol. Biol., 5, 69(1985))に従って調製した。得られたゲノムDNAを制限酵素Sau3AIで限定分解し、更にショ糖密度勾配遠心分離を行なって、10kb以上のDNA断片を得た。

【0067】このDNA断片を、BamHIで切断したλEMBL3ファージベクターのアームと連結後、インビトロ パッケージングキット(ストラタジーン社製、GigapackII Gold)を用いて、パッケージ

13

ングを行ない、大腸菌LE392株に感染させることによって、多数の組換え入ファージを得た。これをアブラナのゲノムDNAライブラリーとした。ライブラリーの大きさは、 1.9×10^4 であった。

【0068】(7) アブラナACCCase遺伝子のゲノムクローンの単離

前記アブラナのゲノムライブラリーを対象に、前述のシロイヌナズナのACCCase-1遺伝子を含むゲノムクローンをプローブとして用いたブランクハイブリダイゼーションにより、アブラナACCCase遺伝子を含むゲノムクローンのスクリーニングを行なった。

【0069】その結果、4種の陽性を示すゲノムクローンを得た。それぞれのクローンについて、 λ DNAを調製して、3種の制限酵素(BamHI, SalI, XhoI)を用いて、挿入断片の物理的地図を作成した。物理的地図の比較から、4種のゲノムクローンは、2群に分類され、それらが染色体中の2つの部位に由来していることが確認された。更に、シロイヌナズナのACCCase遺伝子と相同性を有するアブラナACCCase遺伝子の領域を特定した。図6に、アブラナのACCCase遺伝子を含むゲノムクローンの物理的地図を示す。図6中、制限酵素切断点は、BamHI (Bm), SalI (S), XhoI (Xh) で示した。各物理的地図の下段の細線は、単離された個々のゲノムクローンがカバーする領域を示している。シロイヌナズナのACCCase遺伝子と相同性を有するアブラナACCCase遺伝子の領域を影を付けて示した。

【0070】(8) ACCCaseの発現の増大
シロイヌナズナACCCase-1遺伝子を含むゲノムDNA断片を用いて、センス・ACCCase遺伝子の構築を行なった(図7)。ACCCaseの酵素蛋白質をコードする全塩基配列ならびに発現制御を行なうプロモーター配列とを含むゲノムDNA断片を得るために、3種のゲノムクローン(pATgACC-1a, pATgACC-1b, pATgACC-1c)に分断されているACCCase-1遺伝子領域の連結を行なった後、制限酵素EcoRVで部分分解して、11.8kbのゲノムDNA断片を得た。制限酵素HindIIIならびにEcoRIで切断し、平末端端化したバイナリーベクターpB1121(R. Jefferson et al., EMBO J., 6, 3901-3907 (1987))に上記11.8kbのゲノムDNA断片を挿入し、センス・ACCCase遺伝子とした(図7)。このベクターは、カナマイシン耐性遺伝子(Km^r)をマーカーとして有している。また、図7において、上段の線は、シロイヌナズナACCCase-1遺伝子の物理的地図を示す。物理的地図の下段のa, b, cを付した細線は、ACCCase-1遺伝子の連結に用いたゲノムクローンpATgACC-1a, pATgACC-1b, pATgACC-1cがカバーする領域を示している。

(8)

特開平7-143887

14

【0071】センス・ACCCase遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入法によって作成した。まず、上記センス・ACCCase発現ベクターをアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)に転移させるために、センス・ACCCase発現ベクターを有する大腸菌、転移因子プラスミドpRK2013を有する大腸菌、およびアグロバクテリウムの混合培養を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ リファンピシンと $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むLB寒天培地(1%バクトトリプトン, 0.5%酵母抽出液, 0.5%塩化ナトリウム, 1.2%バクタガー)上で28℃、2日間行なう。センス・ACCCase遺伝子の転移によりカナマイシン耐性の付与されたアグロバクテリウムのコロニーを選抜した。次いで、センス・ACCCase遺伝子を有するアグロバクテリウムを $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ リファンピシンと $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むLB液体培地(1%バクトトリプトン, 0.5%酵母抽出液, 0.5%塩化ナトリウム)で28℃、16時間培養した培養液を用意した。

【0072】一方、シロイヌナズナは、種子をシャーレの寒天培地に播種し、22℃で20日間生育させて、抽合した直後の花茎を切除した。このシロイヌナズナの切り口に、上記のセンス・ACCCase遺伝子を有するアグロバクテリウムの培養液を注射器を用いて注入し、感染を行なわせた。感染後の植物を1カ月間栽培して採種した。その種子を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンの含まれたシャーレ中の寒天培地に播種し、22℃で培養して、カナマイシンに耐性を示す後代植物を選抜し、形質転換シロイヌナズナを得た。更に、形質転換シロイヌナズナは、2カ月間栽培して採種した。この形質転換シロイヌナズナから得られた種子を用いて、ACCCaseの活性をNikolaouらの方法(Arch. Biochem. Biophys., 211, 605-612 (1981))に従って調査した。0.1M Tris-塩酸緩衝液(pH8), 1mM ATP, 2.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 30mM NaH¹⁴CO₃, 1mM ジチオスレイトール, 0.3mM アセチルCoAを含む反応液を作成し、30℃で5分間振とうした。この液を濾紙上にスポットし、室温で未反応のH¹⁴CO₃を蒸発させ、残った反応産物の放射能をトルエン系シンチレーターを用いて測定した。その結果、形質転換シロイヌナズナから得られた種子では、センス・ACCCase遺伝子の付与によって、ACCCaseの活性が増大していた。

【0073】(9) ACCCaseの発現の抑制
シロイヌナズナACCCase-1遺伝子を含むゲノムDNA断片を用いて、アンチセンスACCCase遺伝子の構築を行なった(図8)。前記pATgACC-1bに含まれるACCCase-1遺伝子断片を制限酵素XbaIで切断して、1.8kbのゲノムDNA断片を得た。

(9)

特開平7-143887

15

このゲノムDNA断片をバイナリーベクターpB1121 (R. Jefferson et al., EMBO J., 6, 3901-3907 (1987)) のプロモーター流に位置するXbaIサイトに挿入し、ACCase酵素蛋白質をコードするmRNAと相補的な転写物RNAを合成し得るものを選択し、アンチセンス・ACCase遺伝子とした(図8)。図8において、上段の線は、シロイヌナズナACCase-1遺伝子の物理的地図を示す。

【0074】このアンチセンス・ACCase遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを、前述の方法に準じて、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入法によって作成した。この形質転換シロイヌナズナから種子を得て、ACCaseの活性を前述の方法に準じて測定した。その結果、ACCaseの活性は低下し、アンチセンス・ACCase遺伝子によって、ACCaseの発現が抑制されていることが示された。

【0075】

【実施例2】シロイヌナズナACCase-1mRNAの単離

(1)シロイヌナズナのmRNAの調製とcDNAライブラリーの構築

恒室内で4、5週間栽培したシロイヌナズナの葉葉から、グアニジン法に従って、全RNAを調製した。得られた全RNAから、オリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィーによって、mRNAを精製した。

【0076】このmRNAを鋳型として、cDNA合成キット(アマシャム社製)を利用して、オリゴdTプライマーおよびランダムプライマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。得られた二本鎖cDNAの両末端に、ライゲーションキット(宝酒造社製)を用いてEcoRIアダプターを連結した。これをEcoRIで切断したλgt11ベクターのアームと連結した後、インビトロパッケージングキット(ストラタジーン社製、Gigapack11 Gold)を用いて、ラムダファージのパッケージングを行ない、大腸菌Y1090株に感染させることによって多数の感染入ファージを得た。これをシロイヌナズナのcDNAライブラリーとした。ライブラリーの大きさは、 1.7×10^6 であった。

【0077】(2)シロイヌナズナACCaseのcDNAクローンの単離及びその発現

前記シロイヌナズナのcDNAライブラリーを対象に、シロイヌナズナACCaseのcDNAクローンをブランクハイブリダイゼーションによって、スクリーニングした。プローブには、前述のシロイヌナズナのACCase-1遺伝子の大部分を占めるゲノムクローンpATgACC-1bを用いた。

【0078】その結果、複数の陽性を示すcDNAクローンを得た。それぞれのcDNAクローンについて、挿入断片をEcoRIで切り出して、プラスミドベクター

16

にサブクローニングした。11種類の制限酵素(BamHI, BglII, EcoRI, EcoRV, HincII, HindIII, PstI, SalI, SstI, XbaI, XhoI)を用いて、cDNAクローンの挿入断片の物理的地図を作成し、それぞれのクローンの対応関係を調査した。得られたcDNAクローンは、cDNAの全長をカバーし得ていなかった。そこで、それらcDNAクローンをプローブに用いて、新たにcDNAクローンを単離する作業を繰り返すことによって、ACCaseのcDNA全長をcDNAクローンでカバーするに至った。ACCaseのcDNAの物理的地図を図9に示す。

【0079】図9中、物理的地図の下段の横線は、単離された個々のcDNAクローンがカバーする領域を示している。また、四角で示した部分は、ACCaseをコードしている領域である。

【0080】これらcDNAクローンの挿入断片の塩基配列を決定した。その結果を配列表の配列番号21に示した。cDNAの塩基配列は、2254のアミノ酸をコードしており(配列番号22)、前述のゲノムDNAの解析から得られたピオチンカルボキシラーゼ・ドメイン(配列表の配列番号15)およびピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメイン(配列表の配列番号20)の各配列に対応する領域を含んでいることが確認された。また、そのアミノ酸配列を既に報告のある「ラット」、「ニワトリ」、「酵母」のそれぞれのACCase遺伝子がコードするアミノ酸配列と比較した場合、同一性の程度は、それぞれ38.9%, 38.1%, 39.4%と低かったが、ピオチンカルボキシラーゼ・ドメイン、ピオチンカルボキシルキャリアープロテイン・ドメインおよびトランスカルボキシラーゼ・ドメインでは、共通した類似性が認められ、それらドメインの配置もよく一致していた。これらの結果は、得られたcDNAが、シロイヌナズナのACCaseをコードすることを裏付けるものである。

【0081】(3)cDNAの導入によるACCaseの発現増大

シロイヌナズナACCaseのcDNAを用いて、構造的発現をするセンス・ACCase遺伝子の構築を行った(図10)。ACCaseの酵素蛋白質をコードする全塩基配列を含むcDNA断片を得るために、8種のcDNAクローン(pATcACC-a, pATcACC-b, pATcACC-c, pATcACC-d, pATcACC-e, pATcACC-f, pATcACC-g, pATcACC-h)に分断されているcDNAを連結した後に、制限酵素HindIIIで部分分解して、6.95kbのcDNA断片を得た。バイナリーベクターpB1121 (R. Jefferson et al., EMBO J., 6, 3901-3907 (1987)) の構造的発現プロモーター(カリフラ

(10)

特開平7-143887

17

ワーモザイクウイルス35Sプロモーター)の下流に位置するXbaIサイトとEcoRIサイトを切断し、平滑末端化したものに上記の6950bのcDNA断片を平滑末端化して挿入し、構成的発現現をするセンス・ACCCase遺伝子とした(図10)。このセンス・ACCCase遺伝子は、前述のゲノムDNA断片を用いて構築したセンス・ACCCase遺伝子に比べて、プロモーターが改変されているために遺伝子発現が増大する点で優れるほか、遺伝子領域にイントロンが含まれておらず短いために、宿主染色体への遺伝子の導入が行なわれ易くなる。

【0082】構成的発現現をするセンス・ACCCase遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入法によって作成した。まず、上記の構成的発現現をするセンス・ACCCase発現ベクターをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) に転移させるために、構成的発現現をするセンス・ACCCase発現ベクターを有する大腸菌、転移因子プラスミドpRK2013を有する大腸菌、およびアグロバクテリウムの混合培養を100μg/ml リファンピシンと25μg/ml カナマイシンを含むLB寒天培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母抽出液、0.5%塩化ナトリウム、1.2%バクタアガー)上で28℃、2日間行なうて、構成的発現現をするセンス・ACCCase発現ベクターの転移によりカナマイシン耐性の付与されたアグロバクテリウムのコロニーを選抜した。次いで、センス・ACCCase遺伝子を有するアグロバクテリウムを100μg/ml リファンピシンと25μg/ml カナマイシンを含むLB液体培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母抽出液、0.5%塩化ナトリウム)で28℃、16時間培養した培養液を用意した。

【0083】一方、シロイヌナズナは、種子をシャーレ中の寒天培地に播種し、22℃で20日間生育させて、抽台した直後の花芽を切除した。このシロイヌナズナの切り口に、上記の構成的発現現をするセンス・ACCCase発現ベクターを有するアグロバクテリウムの培養液を注射器を用いて注入し、アグロバクテリウムを感染させた。感染後の植物を1カ月間栽培して採種した。その種子を100μg/mlのカナマイシンの含まれたシャーレ中の寒天培地に播種し、22℃で培養して、カナマイシンに耐性を示す後代植物を選抜し、形質転換シロイヌナズナを得た。形質転換シロイヌナズナは、2カ月間栽培して採種した。

【0084】この形質転換シロイヌナズナから得られた種子を用いて、ACCCaseの活性を、Nikolauらの方法(Arch. Biochem. Biophys. 211, 605-612 (1981))に従って調査した。0.1M Tris-塩酸緩衝液(pH 8)、1mM ATP、2.5mM MgCl₂、50

18

mMKCl、30mM NaH¹⁴CO₃、1mM ジチオスレイトール、0.3mMアセチルCoAを含む反応混液を作成し、30℃で5分間振盪した。この反応混液を濾紙上にスポットし、真空で未反応のH¹⁴CO₃を蒸発させ、残った反応産物の放射能をトルエン系シンチレータを用いて測定した。その結果、形質転換シロイヌナズナから得られた種子では、構成的発現現をするセンス・ACCCase遺伝子の付与によって、前述のゲノムDNA断片を用いて構築したセンス・ACCCase遺伝子の付与された形質転換シロイヌナズナの種子よりも更に、ACCCaseの活性が増大していた。

【0085】

【発明の効果】本発明によって、ACCCase遺伝子あるいはその一部をコードする遺伝子断片が得られる。これらの断片を植物に導入することによって、ACCCaseの酵素活性を増大させて、脂肪含量の増大を求めることが可能である。

【0086】また、本発明によって得られたACCCase遺伝子の全部あるいはその一部を含むDNA断片を用いて、ACCCase遺伝子に対するアンチセンス遺伝子の構築が可能である。これを植物に導入することによって、ACCCase活性を抑えることが可能である。

【0087】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

TATCCGGTCA TNATTAAAGC 20

【0088】配列番号:2

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

TATCCGGTCA TNATTAAAGC 20

【0089】配列番号:3

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列

TATCCGGTGA TNATCAAAGC 20

【0090】配列番号:4

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

19

配列
TATCCGGTGA TNATCAAGGC 20
【0091】配列番号:5
配列の長さ:20
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
TATCCGGTGA TNATAAAGGC 20
【0092】配列番号:6
配列の長さ:20
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
TATCCGGTGA TNATAAAGGC 20
【0093】配列番号:7
配列の長さ:21
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
ATCAGAAGGT CGTNGAAGAA G 21
【0094】配列番号:8
配列の長さ:21
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
ATCAGAAGGT CGTNGAAGAG G 21
【0095】配列番号:9
配列の長さ:21
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
ATCAGAAGGT CGTNGAGGAA G 21
【0096】配列番号:10
配列の長さ:21
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
ATCAGAAGGT CGTNGAGGAG G 21
【0097】配列番号:11
配列の長さ:21
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列

(11)

特開平7-143887

20

CATTTCACTG ACGGATGTT C 21
【0098】配列番号:12
配列の長さ:21
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
CATTTCACTG ACGGATGTT C 21
【0099】配列番号:13
10 配列の長さ:21
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
CATTTCACTG ACGGATGCT C 21
【0100】配列番号:14
配列の長さ:21
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
20 配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列
CATTTCACTG ACGGATGCT C 21
【0101】配列番号:15
配列の長さ:927
配列の型:核酸
鎖の数:二本鎖
配列の種類:Genomic DNA
起源
生物名:シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)
30 配列の特徴
特徴を表す記号: CDS
存在位置: 1..53
特徴を決定した方法: S
特徴を表す記号: Intron
存在位置: 54..134
特徴を決定した方法: P
特徴を表す記号: CDS
存在位置: 135..227
特徴を決定した方法: S
40 特徴を表す記号: Intron
存在位置: 228..359
特徴を決定した方法: P
特徴を表す記号: CDS
存在位置: 360..455
特徴を決定した方法: S
特徴を表す記号: Intron
存在位置: 456..636
特徴を決定した方法: P
特徴を表す記号: CDS
50 存在位置: 637..810

(12)

特開平7-143887

21

22

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: lotren

存在位置: 81L..903

特徴を決定した方法: P

特徴を表す記号: CBS

存在位置: 904..927

特徴を決定した方法: S

他の情報: Hlod111配列

存在位置: 258..263

特徴を決定した方法: S

他の情報: Xbal配列

存在位置: 368..373

特徴を決定した方法: S

他の情報: PstI配列

存在位置: 823..828

特徴を決定した方法: S

配列

TATCGGTGATAATCAAA GCA TCG TCG GGT GGT GGT AAA GGA ATC 47
 Ser Val Ile Ile Lys Ala Ser Trp Gly Gly Gly Lys Gly Ile
 1 5 10 15
 AGC AAG CTCAGCTTCT GTAGATATGC CTTTGTATG TCGACTAAGC CGATTACTAT 103
 Arg Lys
 ATAAGTACTT ATTCTGGTTT TAAATTATA G GTT CAT AAT GAT GAT GAG GTT 155
 Val His Asn Asp Asp Glu Val
 20
 AGC GCT CTA TTC AAG CAA GTT CAG GGT GAG GTC CCA GGC TCA CCA ATA 203
 Arg Ala Leu Phe Lys Glu Val Glu Gly Glu Val Pro Gly Ser Pro Ile
 25 30 35 40
 TTC ATA ATG AAG GTT GGC TCA CAG GTATGCTCC TTAACATAT CTCTTGATCG 257
 Phe Ile Met Lys Val Ala Ser Glu
 45
 AAGCTTAGCT GAGTCTTAT CTGGTACTT TACTAGAGAA TTAAAGTAG TAATGCATTG 317
 CTTTCTTAA CATTTCATT TTTCTAATT TTTTGTAT AG AGT CGG CAT CTA 371
 Ser Arg His Leu
 60
 GAG GTC CAG CTG CTC TGT GAC AAG CAT GGA AAT GTT TCA GCT CTG CAT 419
 Glu Val Glu Leu Leu Cys Asp Lys His Gly Asn Val Ser Ala Leu His
 55 60 65
 AGC GGT GAT TGT AGC GTC CAG AGA AGA CAT CAA AAG GTTGTAGT 465
 Ser Arg Asp Cys Ser Val Glu Arg Arg His Glu Lys
 70 75 80
 GGTGATCTT CGATTITTA TGTCTGCTT AGTGTTATA TAGAAAACA TTCTGTCCAT 525
 TTATTCITAT ATAGTTATAT ACATCAATT TTGTCTCCA ACTGAGTTAT AGTCCCTTTT 585
 AGCGCATTCG AAATTATTCG ATGAGCTCTT ACCTTATGCT TTGTATCGTA G ATC ATA 642
 Ile Ile
 GAG GAG GGT CCA ATT ACT GGT GGT CGG CCA GAA ACT GTC AAG AAA CTT 690
 Glu Glu Gly Pro Ile Thr Gly Arg Pro Pro Glu Thr Val Lys Lys Leu
 85 90 95
 GAA CAA GCA GCT AGA AGG TTG GCT AAG ACT GTT AAC TAT GTT GGA GCT 738
 Glu Glu Ala Ala Arg Arg Leu Ala Lys Ser Val Asn Tyr Val Gly Ala
 100 105 110
 GCT ACT GTT GAG TAT CTC TAC AGT ATG GAC ACT GGG GAG TAC TAC TTC 786
 Ala Thr Val Glu Tyr Leu Tyr Ser Met Asp Thr Gly Glu Tyr Tyr Phe
 115 120 125 130
 TTA GAG CTT AAC OCT CGC TTA CAG GTTGTITCA TACTGCAGCT TTTTGCGTTC 840
 Leu Glu Leu Asn Pro Arg Leu Glu
 135
 AAATATATTC AAGCTCCGCA CTGAAATTT GAATGACTTC TTAACTTGA TGTTCAGGT 900

(13)

特開平7-143887

23
CAG GTT GAG CAC OCT GTC ACT GAA ATG
Val Glu His Pro Val Thr Glu Met
140 145

24
927

【0102】配列番号:16
配列の長さ:19
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列
TGATCATCTT CATAACYTC 19

【0103】配列番号:17
配列の長さ:19
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列
TGATCATCTT CATGACYTC 19

【0104】配列番号:18
配列の長さ:19
配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)

配列
TGACCATCTT CATGACYTC 19

【0105】配列番号:19
配列の長さ:19

*配列の型:核酸
鎖の数:一本鎖
配列の種類:他の核酸(合成オリゴヌクレオチド)
配列

TGACCATCTT CATGACYTC 19
【0106】配列番号:20

10 配列の長さ:292
配列の型:核酸
鎖の数:二本鎖
配列の種類:Genomic DNA

起源
生物名:シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)

配列の特徴

特徴を表す記号:CDS

存在位置:1..42

特徴を決定した方法:S

20 特徴を表す記号:intron

存在位置:43..139

特徴を決定した方法:P

特徴を表す記号:CDS

存在位置:140..292

特徴を決定した方法:S

*

配列
GGA ACT CGT CTT CTC ATT GAT GGA AGA ACT TGT TTG CTA CAG 42
Gly Thr Arg Leu Leu Ile Asp Gly Arg Thr Cys Leu Leu Gln
1 5 10
GTTTCGCTA AITTTTTGT GTGTTTACCA TTTTACTTCA CGTTTCTCTG AAGTCATCTT 102
TAGCTTTTAA CCTGCTCTGC AATTTTGCT TATTCAG AAT GAC CAC GAT CCA TCA 157
Asn Asp His Asp Pro Ser
15 20
AAG TTA ATG GCT GAG ACA CCG TGC AAG TTG ATG AGG TAT TTG ATT TCC 205
Lys Leu Met Ala Glu Thr Pro Cys Lys Leu Met Arg Tyr Leu Ile Ser
25 30 35
GAC AAC AGC AAT ATT GAC GCT GAT ACG CCT TAT GGC GAA GTT GAG GTC 253
Asp Asn Ser Asn Ile Asp Ala Asp Thr Pro Tyr Ala Glu Val Glu Val
40 45 50
ATG AAG ATG TGC ATG CCA CTT CTT TCA CCT GCT TCA GGA 292
Met Lys Met Cys Met Pro Leu Leu Ser Pro Ala Ser Gly
55 60 65

【0107】配列番号:21
配列の長さ:7340
配列の型:核酸
鎖の数:二本鎖
配列の種類:cDNA to mRNA
起源

配列

生物名:シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)

配列の特徴

特徴を表す記号:CDS

存在位置:408..7169

特徴を決定した方法:P

Scanned 12/10/2004

(14)

特開平7-143887

25	26
TCGCCAATC TCTGAAACA GAGACTGCA TAGTCTCTGA AGTCATCTAT AATCTGCTG	60
CTTAGAAAAC CCGGTATTC ATCTTCAAGA TCTGTGGTA TGCCCAATG AAAGATAGTA	120
ACAAGAGGAG TGATTTCAIT GCGTAAGAGT TCATCAATAA CATCAITGTA AAACITAAIT	180
CCITCTTAC TAACCTCTCT ATCCCTTTG CCATAAGGTA GAACCTGGG CCAAGCAATG	240
GAAAGCCGAA AGGAATCCAT GTTATATCC TTCATTCTCT TAATATCTTC CTCTCTGTA	300
TTCTTAGCT AAACACCCAC AATCTGGCC TTCTCTGATC CCTCTTAAG CCAATTTGTA	360
TCTCTGCTC CTACAGAT ATATCTGAG CTAAAGGCC AGTGACA ATG GCT GGC	416
	Met Ala Gly
	1
TGG GTT AAC GGG AAT CAT AGT GCT GTA GGA CCT GGT ATA AAT TAT GAG	462
Ser Val Asn Gly Asn His Ser Ala Val Gly Pro Gly Ile Asn Tyr Glu	
5 10 15	
ACG GTG TCT CAA GTG GAT GAG TTC TGT AAA GCA CTT AGA GGG AAA AGG	510
Thr Val Ser Gln Val Asp Glu Phe Cys Lys Ala Leu Arg Gly Lys Arg	
20 25 30 35	
CCG ATC CAT AGT ATT TTG ATA GCT AAC AAT GGA ATG GCG GCT GTG AAG	558
Pro Ile His Ser Ile Leu Ile Ala Asn Asn Gly Met Ala Ala Val Lys	
40 45 50	
TTT ATA CGT AGT GTC AGA ACA TGG GCT TAT GAA ACA TTT GGT ACG GAA	606
Phe Ile Arg Ser Val Arg Thr Trp Ala Tyr Glu Thr Phe Gly Thr Glu	
55 60 65	
AAA GCC ATA TTG TTG GTG GGG ATG GCA ACC OCT GAA GAC ATG CCG ATC	654
Lys Ala Ile Leu Leu Val Gly Met Ala Thr Pro Glu Asp Met Arg Ile	
70 75 80	
AAT GCG GAG CAT ATC AGA ATC OCT GAT CAG TTT GTT GAG GTT CCC GGA	702
Asn Ala Glu His Ile Arg Ile Ala Asp Gln Phe Val Glu Val Pro Gly	
85 90 95	
GGA ACC AAC AAT AAC AAT TAT OCT AAC GTT CAG CTG ATT GTG GAG ATG	750
Gly Thr Asn Asn Asn Asn Tyr Ala Asn Val Gln Leu Ile Val Glu Met	
100 105 110 115	
GCT GAA GTA ACA CCG CTG GAT GCA GTT TGG OCT GGT TGG GGT CAT CCA	798
Ala Glu Val Thr Arg Val Asp Ala Val Trp Pro Gly Trp Gly His Ala	
120 125 130	
TCT GAA AAC CCC GAA TTA OCT GAT GCC CTA GAT GCA AAA GGA ATC ATA	846
Ser Glu Asn Pro Gln Leu Pro Asp Ala Leu Asp Ala Lys Gly Ile Ile	
135 140 145	
TTT CTT GGT OCT CCA GCA TCT TCA ATG GCA CCA CTG GGA GAT AAG ATT	894
Phe Leu Gly Pro Pro Ala Ser Ser Met Ala Ala Leu Gly Asp Lys Ile	
150 155 160	
GGT TCT TCG TTG ATT GCA CAA OCT GCT GAT GTA CCC ACT CTG CCA TGG	942
Gly Ser Ser Leu Ile Ala Gln Ala Ala Asp Val Pro Thr Leu Pro Trp	
165 170 175	
AGT GGT TGC CAT GTT AAA ATA OCT CCT AAT AGC AAC TTG GTA ACC ATC	990
Ser Gly Ser His Val Lys Ile Pro Pro Asn Ser Asn Leu Val Thr Ile	
180 185 190 195	
CCA GAG GAG ATC TAC CCG CAA GCA TGT GTC TAC ACA ACT GAA GAA GCG	1038
Pro Glu Glu Ile Tyr Arg Gln Ala Cys Val Tyr Thr Thr Glu Glu Ala	
200 205 210	
ATT GCT AGC TGT CAA GTT GTC GGT TAC CCA GCA ATG ATC AAA GCA TCG	1086
Ile Ala Ser Cys Glu Val Val Gly Tyr Pro Ala Met Ile Lys Ala Ser	

(16)

特開平7-143887

29	His Val Phe Ala Phe Gly Glu Ser Arg Ala Leu Ala Ile Ala Asn Met	30
485	490	495
GTT CTT GGG CTA AAA GAA ATT CAG ATC CGT GGA GAA ATT AGG ACT AAC	1950	
Val Leu Gly Leu Lys Glu Ile Gln Ile Arg Gly Glu Ile Arg Thr Asn		
500	505	510
GTT GAC TAC ACG ATC GAC CTT TTA CAT GCT TCT GAT TAC CGT GAT AAC	1988	
Val Asp Tyr Thr Ile Asp Leu Leu His Ala Ser Asp Tyr Arg Asp Asn		
520	525	530
AAA ATT CAC ACT GGT TGG TTG GAT AGT AGG ATT GCT ATG GGG GTC AGA	2046	
Lys Ile His Thr Gly Trp Leu Asp Ser Arg Ile Ala Met Arg Val Arg		
535	540	545
GCT GAG AGG CCG CCA TGG TAT CTC TCT GTT GTC GGC GGA GCT CTC TAT	2094	
Ala Glu Arg Pro Pro Trp Tyr Leu Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Tyr		
550	555	560
AAA GCA TCA GCG ACC AGT GCT GCT GTG GTT TCA GAT TAC CTT GGT TAT	2142	
Lys Ala Ser Ala Thr Ser Ala Ala Val Val Ser Asp Tyr Val Gly Tyr		
565	570	575
CTG GAG AAG GGG CAA ATC CCT CCA AAG CAT ATA TCT CTT GTA CAT TCT	2190	
Leu Glu Lys Gly Gln Ile Pro Pro Lys His Ile Ser Leu Val His Ser		
580	585	590
CAA GTG TCT CTG AAT ATT GAA GGA AGT AAA TAT ACG ATT GAT GTA GTC	2238	
Gln Val Ser Leu Asn Ile Glu Gly Ser Lys Tyr Thr Ile Asp Val Val		
600	605	610
CGG GGT GGA TCA GCA ACC TAC AGG CTA AGA ATG AAC AAG TCA GAA GTG	2286	
Arg Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Arg Leu Arg Met Asn Lys Ser Glu Val		
615	620	625
GTA GCA GAA ATA CAC ACT CTA CGT GAT GGA GGT CTG TTG ATG CAG TTG	2334	
Val Ala Glu Ile His Thr Leu Arg Asp Gly Gly Leu Leu Met Gln Leu		
630	635	640
GAT GGC AAA AGC CAT GTG ATA TAT GCA GAG GAA GAA GCT GCA GGA ACT	2382	
Asp Gly Lys Ser His Val Ile Tyr Ala Glu Glu Glu Ala Ala Gly Thr		
645	650	655
CGT CTT CTC ATT GAT GGA AGA ACT TGT TTG CTA CAG AAT GAC CAC GAT	2430	
Arg Leu Leu Ile Asp Gly Arg Thr Cys Leu Leu Gln Asn Asp His Asp		
660	665	670
CCA TCA AAG TTA ATG GCT GAG ACA CCG TGC AAG TTG ATG AGG TAT TTG	2478	
Pro Ser Lys Leu Met Ala Glu Thr Pro Cys Lys Leu Met Arg Tyr Leu		
680	685	690
ATT TCC GAC AAC AGC AAT ATT CAC GCT GAT ACG CCT TAT GCC GAA GTT	2526	
Ile Ser Asp Asn Ser Asn Ile Asp Ala Asp Thr Pro Tyr Ala Glu Val		
695	700	705
GAG GTC ATG AAG ATG TGC ATG CCA CTT CTT TCA CCT GCT TCA GGA GTT	2574	
Glu Val Met Lys Met Cys Met Pro Leu Leu Ser Pro Ala Ser Gly Val		
710	715	720
ATC CAT TTT AAA ATG TCT GAA GGA CAA GCC ATG CAG GCT GGT GAA CTT	2622	
Ile His Phe Lys Met Ser Glu Gly Gln Ala Met Gln Ala Gly Glu Leu		
725	730	735
ATA GCC AAT CTT GAT CTT GAT GAT CCT ICT OCT GTA AGA AAG GCC GAA	2670	
Ile Ala Asn Leu Asp Leu Asp Asp Pro Ser Ala Val Arg Lys Ala Glu		
740	745	750
		755

(17)

特開平7-143887

31	32
CCC TTC CAT GGA AGT TTC CCA AGA TTA GGG CTT CCA ACT GCA ATA TCC	2718
Pro Phe His Gly Ser Phe Pro Arg Leu Gly Leu Pro Thr Ala Ile Ser	
760 765 770	
GGT AGA GTT CAT CAG AGA TGT GGC GCA ACA TTA AAT GCT GCA CGC ATG	2766
Gly Arg Val His Gln Arg Cys Ala Ala Thr Leu Asn Ala Ala Arg Met	
775 780 785	
ATT CTT GCT GGC TAT CAG CAT AAA GTA CAT GAG GTT GTT CAA GAC TTA	2814
Ile Leu Ala Gly Tyr Glu His Lys Val Asp Glu Val Val Gln Asp Leu	
790 795 800	
CTT AAT TCC CTT GAT ACC CCT GAA CTC CCA TTT CTT CAG TGG CAA GAG	2862
Leu Asn Cys Leu Asp Ser Pro Glu Leu Pro Phe Leu Gln Trp Gln Glu	
805 810 815	
TGC TTT GCA GTT CTG GCG ACA CGA CTA CCT AAA AAT CTC AGG AAC ATG	2910
Cys Phe Ala Val Leu Ala Thr Arg Leu Pro Lys Asn Leu Arg Asn Met	
820 825 830 835	
CTA GAA TCA AAG TAT AGG GAA TTT CAG AGT ATT TCC AGA AAC TCT TTG	2958
Leu Glu Ser Lys Tyr Arg Glu Phe Glu Ser Ile Ser Arg Asn Ser Leu	
840 845 850	
ACC ACC GAT TTC CCT GCC AAA CTT TTA AAA GGC ATT CTT GAG GCA CAT	3006
Thr Thr Asp Phe Pro Ala Lys Leu Leu Lys Gly Ile Leu Glu Ala His	
855 860 865	
TTA TCT TCT TGT GAT GAG AAA GAG AGA GGT GCC CTT GAA AGG CTC ATT	3054
Leu Ser Ser Cys Asp Glu Lys Glu Arg Gly Ala Leu Glu Arg Leu Ile	
870 875 880	
GAA CCA TTG ATG AGC CTT GCA AAA TCT TAT GAA GGT GGT AGA GAA AGT	3102
Glu Pro Leu Met Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Glu Gly Gly Arg Glu Ser	
885 890 895	
CAT GCC CGT GTT ATT GTT CAT TCT CTC TTT GAA GAA TAT CTA TCA GTA	3150
His Ala Arg Val Ile Val His Ser Leu Phe Glu Glu Tyr Leu Ser Val	
900 905 910 915	
GAA GAA TTA TTC AAT GAT AAC ATG CTG GCT GAT GTT ATA GAA CGC ATG	3198
Glu Glu Leu Phe Asn Asp Asn Met Leu Ala Asp Val Ile Glu Arg Met	
920 925 930	
CGT CAG CTA TAC AAG AAA GAT CTG TTG AAA ATT GTG GAT ATA GTG CTC	3246
Arg Gln Leu Tyr Lys Lys Asp Leu Leu Lys Ile Val Asp Ile Val Leu	
935 940 945	
TCA CAC CAG GGC ATA AAA AAC AAA AAC AAA CTC GTT CTC CGG CTC ATG	3294
Ser His Gln Gly Ile Lys Asn Lys Asn Lys Leu Val Leu Arg Leu Met	
950 955 960	
GAG CAG CTT GTT TAC CCT AAT CCT GCT GCT TAC AGA GAT AAA CTT ATT	3342
Glu Gln Leu Val Tyr Pro Asn Pro Ala Ala Tyr Arg Asp Lys Leu Ile	
965 970 975	
CGA TTC TCA ACA CTT AAC CAT ACT AAC TAC TCT GAG TTG GCG CTC AAG	3390
Arg Phe Ser Thr Leu Asn His Thr Asn Tyr Ser Glu Leu Ala Leu Lys	
980 985 990 995	
GCG AGT CAA TTA CTT GAA CAG ACC AAA CTA AGT GAG CTT CGT TCA AAC	3438
Ala Ser Gln Leu Leu Glu Gln Thr Lys Leu Ser Glu Leu Arg Ser Asn	
1000 1005 1010	
ATT GCT AGA AGC CTT TCA GAG TTA GAA ATG TTT ACA GAG GAC GGA GAA	3486
Ile Ala Arg Ser Leu Ser Glu Leu Glu Met Phe Thr Glu Asp Gly Glu	

(18)

特開平7-143887

33	1015	1020	1025	34
	AAT ATG GAT ACT CCC AAG AGG AAA ACT GCC ATT AAT GAA AGA ATA GAA			3534
	Asp Met Asp Thr Pro Lys Arg Lys Ser Ala Ile Asn Glu Arg Ile Glu			
	1030	1035	1040	
	GAT CTT GTA AGC GCA TCT TTA GCT GTT GAA GAC GCT CTC GTG GGA CTA			3582
	Asp Leu Val Ser Ala Ser Leu Ala Val Glu Asp Ala Leu Val Gly Leu			
	1045	1050	1055	
	TTT GAC CAT AGC GAT CAC ACA CTT CAA AGA CGG GTT GTT GAG ACT TAT			3630
	Phe Asp His Ser Asp His Thr Leu Glu Arg Arg Val Val Glu Thr Tyr			
	1060	1065	1070	1075
	ATT CGC AGA TTA TAC CAG CCC TAC GTC GTT AAA GAT AGC GTG AGG ATG			3678
	Ile Arg Arg Leu Tyr Glu Pro Tyr Val Val Lys Asp Ser Val Arg Met			
	1080	1085	1090	
	CAG TGG CAC GGT TCT GGT CTT CTT GCT TCC TGG GAG TTC CTA GAG GAG			3726
	Glu Trp His Arg Ser Gly Leu Leu Ala Ser Trp Glu Phe Leu Glu Glu			
	1095	1100	1105	
	CAT ATG GAA AGA AAA AAC ATT GGC TTA GAC GAT CCC GAC ACA TCT GAA			3774
	His Met Glu Arg Lys Asn Ile Gly Leu Asp Asp Pro Asp Thr Ser Glu			
	1110	1115	1120	
	AAA GGA TTG GTT GAG AAG GGT AGT AAG AGA AAA TGG GCG GCT ATG GTT			3822
	Lys Gly Leu Val Glu Lys Arg Ser Lys Arg Lys Trp Gly Ala Met Val			
	1125	1130	1135	
	ATA ATC AAA TCT TTG CAG TTT CTT CCA AGT ATA ATA AGT GCA GCA TTG			3870
	Ile Ile Lys Ser Leu Glu Phe Leu Pro Ser Ile Ile Ser Ala Ala Leu			
	1140	1145	1150	1155
	AGA GAA ACA AAG CAC AAC GAC TAT GAA ACT GCG GGA GCT CCT TTA TCT			3918
	Arg Glu Thr Lys His Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Gly Ala Pro Leu Ser			
	1160	1165	1170	
	GGC AAT ATG ATG CAC ATT GCT ATT CTG GGC ATC AAC AAC CAG ATG AGT			3966
	Gly Asn Met Met His Ile Ala Ile Val Gly Ile Asn Asn Glu Met Ser			
	1175	1180	1185	
	CTG CTT CAG GAC AGT GGG GAT GAA GAC CAA GCT CAG GAA AGA CTA AAC			4014
	Leu Leu Glu Asp Ser Gly Asp Glu Asp Glu Ala Glu Glu Arg Val Asn			
	1190	1195	1200	
	AAG TTG GCC AAA ATT CTT AAA GAG GAA GAA GTG AGT TCA AGC CTC TGT			4062
	Lys Leu Ala Lys Ile Leu Lys Glu Glu Glu Val Ser Ser Ser Leu Cys			
	1205	1210	1215	
	TCT GCC GGT CTT GGT GTA ATC AGC TGT ATA ATT CAG GGA GAT GAA GGA			4110
	Ser Ala Gly Val Gly Val Ile Ser Cys Ile Ile Glu Arg Asp Glu Gly			
	1220	1225	1230	1235
	CGA ACA CCC ATG AGA CAT TCT TTC CAT TGG TCG TTG GAG AAA CAG TAT			4158
	Arg Thr Pro Met Arg His Ser Phe His Trp Ser Leu Glu Lys Glu Tyr			
	1240	1245	1250	
	TAT GTA GAA GAG CCG TTG CTG GGT CAT CTT GAA OCT CCT CTG TCC ATT			4206
	Tyr Val Glu Glu Pro Leu Leu Arg His Leu Glu Pro Pro Leu Ser Ile			
	1255	1260	1265	
	TAC CTT GAG TTG GAT AAG CTG AAA GGA TAC TCA AAT ATA CAA TAT ACG			4256
	Tyr Leu Glu Leu Asp Lys Leu Lys Gly Tyr Ser Asn Ile Glu Tyr Thr			
	1270	1275	1280	
	OCT TCT CGA GAT GGT CAA TGC CAT CTG TAT ACT GTT ACA GAC AAG CCA			4304

-731-

(20)

特開平7-143887

37	GAA GGT TCT TCG GGT ACA TCT CTA GAT CTG GTT GAA AGA CCA CCC GGT	38	5120
	Glu Gly Ser Ser Gly Thr Ser Leu Asp Leu Val Glu Arg Pro Pro Gly		
	1560 1565 1570		
	CTC AAC GAC TTT GGA ATG GTT GCC TGC TGC CTA GAT ATG TCG ACC CCA		5168
	Leu Asn Asp Phe Gly Met Val Ala Trp Cys Leu Asp Met Ser Thr Pro		
	1575 1580 1585		
	GAG TTT CCT ATG GCG CGG AAA CTT CTC GTG ATT GCG AAT GAT GTC ACC		5216
	Glu Phe Pro Met Gly Arg Lys Leu Leu Val Ile Ala Asn Asp Val Thr		
	1590 1595 1600		
	TTC AAA GCT GGT TCT TTT GGT CCT AGA GAG GAC GCG TTT TTC CTT GCT		5264
	Phe Lys Ala Gly Ser Phe Gly Pro Arg Glu Asp Ala Phe Phe Leu Ala		
	1605 1610 1615		
	GTT ACT GAA CTC GCT TGT GCC AAG AAG CTT CCC TTG ATT TAC TTG GCA		5312
	Val Thr Glu Leu Ala Cys Ala Lys Lys Leu Pro Leu Ile Tyr Leu Ala		
	1620 1625 1630 1635		
	GCA AAT TCT GGT GCC CGA CTT GGG GTT GCT GAA GAA GTC AAA GCC TGC		5360
	Ala Asn Ser Gly Ala Arg Leu Gly Val Ala Glu Glu Val Lys Ala Cys		
	1640 1645 1650		
	TTC AAA GTT GGA TCG TCG GAT GAA ATT TCC CCT GAG AAT GGT TTT CAG		5408
	Phe Lys Val Gly Trp Ser Asp Glu Ile Ser Pro Glu Asn Gly Phe Glu		
	1655 1660 1665		
	TAT ATA TAC CTA AGC CCT GAA GAC CAC GAA AGG ATT GGA TCA TCT GTC		5456
	Tyr Ile Tyr Leu Ser Pro Glu Asp His Glu Arg Ile Gly Ser Ser Val		
	1670 1675 1680		
	ATT GCC CAT GAA GTA AAG CTC TCT AGT GGG GAA ACT AGG TCG CTC ATT		5504
	Ile Ala His Glu Val Lys Leu Ser Ser Gly Glu Thr Arg Trp Val Ile		
	1685 1690 1695		
	GAT ACG ATC GTT GGC AAA GAA GAT GGT ATT GGT GTA GAG AAC TTA ACA		5552
	Asp Thr Ile Val Gly Lys Glu Asp Gly Ile Gly Val Glu Asn Leu Thr		
	1700 1705 1710 1715		
	GGA AGT GGG GCC ATA GCG GGT GCT TAC TCA AAG GCA TAC AAT GAA ACT		5600
	Gly Ser Gly Ala Ile Ala Gly Ala Tyr Ser Lys Ala Tyr Asn Glu Thr		
	1720 1725 1730		
	TTT ACT TTA ACC TTT GTT AGT GGA AGA ACG GTT GGA ATT GGT GCT TAT		5648
	Phe Thr Leu Thr Phe Val Ser Gly Arg Thr Val Gly Ile Gly Ala Tyr		
	1735 1740 1745		
	CTT GCC GCG CTA GGT ATG GCG TGC ATA CAG AGA CTT GAT CAG GCG ATC		5696
	Leu Ala Arg Leu Gly Met Arg Cys Ile Glu Arg Leu Asp Glu Pro Ile		
	1750 1755 1760		
	ATC TTG ACT GGC TTC TCT ACA CTC AAC AAG TTA CTT GCG GGT GAG GTC		5744
	Ile Leu Thr Gly Phe Ser Thr Leu Asn Lys Leu Leu Gly Arg Glu Val		
	1765 1770 1775		
	TAT ACG TCT CAC ATG CAA CTG GGT GCG GCG AAA ATC ATC GCG ACA AAT		5792
	Tyr Ser Ser His Met Glu Leu Gly Gly Pro Lys Ile Met Gly Thr Asn		
	1780 1785 1790 1795		
	GGT GTT GTT CAT CTT ACA GTC TCA GAT GAT CTT GAA GCG GTA TCA CCA		5840
	Gly Val Val His Leu Thr Val Ser Asp Asp Leu Glu Gly Val Ser Ala		
	1800 1805 1810		
	ATT CTC AAC TCG CTC AGC TAC ATT CCT GCT TAC GTG GGT GGT CCT CTT		5888
	Ile Leu Asn Trp Leu Ser Tyr Ile Pro Ala Tyr Val Gly Gly Pro Leu		

(21)

特開平7-143887

39	1815	1820	1825	40
	CCT GTT CTT GCC CCT TTA GAT CCA CCG GAG AGA ATT GTG GAG TAT GTC			5936
	Pro Val Leu Ala Pro Leu Asp Pro Pro Glu Arg Ile Val Glu Tyr Val			
	1830	1835	1840	
	CCA GAG AAC TCT TGC GAC CCA CGA GCG GCT ATA GCT GGC GTC AAA GAC			5984
	Pro Glu Asn Ser Cys Asp Pro Arg Ala Ala Ile Ala Gly Val Lys Asp			
	1845	1850	1855	
	AAT AOC GGT AAA TGG CTT CGA GGT ATC TTT GAT AAA AAT AGT TTC ATT			6032
	Asn Thr Gly Lys Trp Leu Gly Gly Ile Phe Asp Lys Asn Ser Phe Ile			
	1860	1865	1870	1875
	GAG ACT CTT GAA GCG TGG GCA AGG ACG GTA GTC ACT GGT AGA GCC AAG			6080
	Glu Thr Leu Glu Gly Trp Ala Arg Thr Val Val Thr Gly Arg Ala Lys			
	1880	1885	1890	
	CTC GGG GGA ATA CCC GTT GGA GTT GTT GCA GTT GAG ACA CAG ACT GTC			6128
	Leu Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Val Ala Val Glu Thr Glu Thr Val			
	1895	1900	1905	
	ATC CAG ATC ATC CCA GCC GAT CCT GGA CAG CTT GAC TCT CAT GAA AGA			6176
	Met Glu Ile Ile Pro Ala Asp Pro Gly Glu Leu Asp Ser His Glu Arg			
	1910	1915	1920	
	GTG GTT CCG CAA GCA GCG CAA GTC TGG TTT CCT GAT TCA GCG GCC AAG			6224
	Val Val Pro Glu Ala Gly Glu Val Trp Phe Pro Asp Ser Ala Ala Lys			
	1925	1930	1935	
	ACT GCT CAA GCG CTT ATG GAT TTC AAC CCG GAA GAG CTT CCA TTG TTT			6272
	Thr Ala Glu Ala Leu Met Asp Phe Asn Arg Glu Glu Leu Pro Leu Phe			
	1940	1945	1950	1955
	ATC CTA GCG AAC TGG AGA GCG TTT TCA GGT GCG CAG AGA GAT CTT TTC			6320
	Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly Gly Glu Arg Asp Leu Phe			
	1960	1965	1970	
	GAA GGA ATA CTT CAG GCA GGT TCA ACT ATA CTA GAA AAT CTG AGA ACC			6368
	Glu Gly Ile Leu Glu Ala Gly Ser Thr Ile Val Glu Asn Leu Arg Thr			
	1975	1980	1985	
	TAT CGT CAG CCA GTG TTT GTG TAC ATC CCA ATC ATG GGA GAG CTG CGC			6416
	Tyr Arg Glu Pro Val Phe Val Tyr Ile Pro Met Met Gly Glu Leu Arg			
	1990	1995	2000	
	GGT GGA GCG TGG CTT GTT GTT GAC ACG CAG ATA AAT TCG GAT TAT GTT			6464
	Gly Gly Ala Trp Val Val Val Asp Ser Glu Ile Asn Ser Asp Tyr Val			
	2005	2010	2015	
	GAA ATG TAT GCT GAT GAA ACA GCT CGT GGA AAT GTG CTT GAG CCA GAA			6512
	Glu Met Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Arg Gly Asn Val Leu Glu Pro Glu			
	2020	2025	2030	2035
	GGG ACA ATA GAG ATA AAA TTT AGA ACA AAA CAG CTA TTA GAG TGC ATG			6560
	Gly Thr Ile Glu Ile Lys Phe Arg Thr Lys Glu Leu Leu Glu Cys Met			
	2040	2045	2050	
	GCA AGC TTG GAC CAG AAG CTA ATC AGT CTG AAA GCA AAA CTG CAA GAT			6608
	Gly Arg Leu Asp Glu Lys Leu Ile Ser Leu Lys Ala Lys Leu Glu Asp			
	2055	2060	2065	
	GCC AAG CAA AGC GAG GCC TAT GCA AAC ATC GAG CTT CTC CAG CAA CAG			6656
	Ala Lys Glu Ser Glu Ala Tyr Ala Asn Ile Glu Leu Leu Glu Glu Glu			
	2070	2075	2080	
	ATT AAA GCC CGA GAG AAA CAG CTT TTA CCA GTT TAT ATC CAA ATC GCC			6704

(22)

特開平7-143887

41 42

Ile Lys Ala Arg Glu Lys Glu Leu Leu Pro Val Tyr Ile Glu Ile Ala
 2085 2090 2095

ACC AAA TTT GCA GAA CTT CAT GAC ACT TCC ATG AGA ATG GCT GCA AAG 6752
 Thr Lys Phe Ala Glu Leu His Asp Thr Ser Met Arg Met Ala Ala Lys
 2100 2105 2110 2115

GGA GTG ATC AAA AGT GTT GTG GAA TCG ACC GGC TCG CCG TCC TTC TTC 6798
 Gly Val Ile Lys Ser Val Val Glu Trp Ser Gly Ser Arg Ser Phe Phe
 2120 2125 2130

TAC AAA AAG CTC AAT AGG ACA ATC GCT GAG ACC TCT CTT GTG AAA AAC 6848
 Tyr Lys Lys Leu Asn Arg Arg Ile Ala Glu Ser Ser Leu Val Lys Asn
 2135 2140 2145

GTA AGA GAA GCA TCT GGA GAC AAC TTA GCA TAT AAA TCT TCA ATG CGT 6896
 Val Arg Glu Ala Ser Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Lys Ser Ser Met Arg
 2150 2155 2160

CTG ATT CAG GAT TCG TTC TGC AAC TCT GAT ATT GCA AAG GGG AAA GAA 6944
 Leu Ile Glu Asp Trp Phe Cys Asn Ser Asp Ile Ala Lys Gly Lys Glu
 2165 2170 2175

GAA GCT TCG ACA GAC GAC CAA GTG TTC TTT ACA TGG AAG GAC AAT GTT 6992
 Glu Ala Trp Thr Asp Asp Glu Val Phe Phe Thr Trp Lys Asp Asn Val
 2180 2185 2190 2195

AGT AAC TAC GAG TTG AAG CTG AGC GAG TTG ACA GCG CAG AAA CTA CTG 7040
 Ser Asn Tyr Glu Leu Lys Leu Ser Glu Leu Arg Ala Glu Lys Leu Leu
 2200 2205 2210

AAC CAA CTT GCA GAG ATT GGG AAT TCC TCA GAT TTG CAA GCT CTG CCA 7088
 Asn Glu Leu Ala Glu Ile Gly Asn Ser Ser Asp Leu Glu Ala Leu Pro
 2215 2220 2225

CAA GGA CTT GCT AAT CTT CTA AAC AAG GTG GAG CCG TCG AAA AGA GAA 7136
 Glu Gly Leu Ala Asn Leu Leu Asn Lys Val Glu Pro Ser Lys Arg Glu
 2230 2235 2240

GAG CTG GTG GCT GCT ATT GCA AAG GTC TTG GGT TGACTGATAT CGAAGACTTT 7189
 Glu Leu Val Ala Ala Ile Arg Lys Val Leu Gly
 2245 2250

ACCTTCTAAT CCAAGAAAGA TCGACATTTA AAGTTTCTT GTGTCCGTTT GGATTGATAA 7249
 TTATATATT GTTGTGCACA GTTGTAAATG TTGTGTAGC TTGTGATTT CCGTATAAAC 7309
 AATACGCCAA TAATTCATTC AACAAAAAA A 7340

[0108] 配列番号: 22

起源

配列の長さ: 2254

生物名: シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)

配列の型: アミノ酸

配列

Met Ala Gly Ser Val Asn Gly Asn His Ser Ala Val Gly Pro Gly Ile
 1 5 10 15

Asn Tyr Glu Thr Val Ser Glu Val Asp Glu Phe Cys Lys Ala Leu Arg
 20 25 30

Gly Lys Arg Pro Ile His Ser Ile Leu Ile Ala Asn Asn Gly Met Ala
 35 40 45

Ala Val Lys Phe Ile Arg Ser Val Arg Thr Trp Ala Tyr Glu Thr Phe
 50 55 60

Gly Thr Glu Lys Ala Ile Leu Leu Val Gly Met Ala Thr Pro Glu Asp
 65 70 75 80

Met Arg Ile Asn Ala Glu His Ile Arg Ile Ala Asp Glu Phe Val Glu

(23)

特開平7-143887

43 85 90 96 44
 Val Pro Gly Gly Thr Asn Asn Asn Asn Tyr Ala Asn Val Glu Leu Ile
 100 105 110
 Val Glu Met Ala Glu Val Thr Arg Val Asp Ala Val Trp Pro Gly Trp
 115 120 125
 Gly His Ala Ser Glu Asn Pro Glu Leu Pro Asp Ala Leu Asp Ala Lys
 130 135 140
 Gly Ile Ile Phe Leu Gly Pro Pro Ala Ser Ser Met Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160
 Asp Lys Ile Gly Ser Ser Leu Ile Ala Glu Ala Ala Asp Val Pro Thr
 165 170 175
 Leu Pro Trp Ser Gly Ser His Val Lys Ile Pro Pro Asn Ser Asn Leu
 180 185 190
 Val Thr Ile Pro Glu Glu Ile Tyr Arg Glu Ala Cys Val Tyr Thr Thr
 195 200 205
 Glu Glu Ala Ile Ala Ser Cys Glu Val Val Gly Tyr Pro Ala Met Ile
 210 215 220
 Lys Ala Ser Trp Gly Gly Gly Gly Lys Gly Ile Arg Lys Val His Asn
 225 230 235 240
 Asp Asp Glu Val Arg Ala Leu Phe Lys Glu Val Glu Gly Glu Val Pro
 245 250 255
 Gly Ser Pro Ile Phe Ile Met Lys Val Ala Ser Glu Ser Arg His Leu
 260 265 270
 Glu Val Glu Leu Leu Cys Asp Lys His Gly Asn Val Ser Ala Leu His
 275 280 285
 Ser Arg Asp Cys Ser Val Glu Arg Arg His Glu Lys Ile Ile Glu Glu
 290 295 300
 Gly Pro Ile Thr Val Ala Pro Pro Glu Thr Val Lys Lys Leu Glu Glu
 305 310 315 320
 Ala Ala Arg Arg Leu Ala Lys Ser Val Asn Tyr Val Gly Ala Ala Thr
 325 330 335
 Val Glu Tyr Leu Tyr Ser Met Asp Thr Gly Glu Tyr Tyr Phe Leu Glu
 340 345 350
 Leu Asn Pro Arg Leu Glu Val Glu His Pro Val Thr Glu Trp Ile Ala
 355 360 365
 Glu Ile Asn Leu Pro Ala Ala Glu Val Ala Val Gly Met Gly Ile Pro
 370 375 380
 Leu Trp Glu Ile Pro Glu Ile Arg Arg Phe Tyr Gly Ile Glu His Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Tyr Asp Ser Trp Arg Lys Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Phe
 405 410 415
 Asp Phe Asp Lys Ala Glu Ser Ile Arg Pro Lys Gly His Cys Val Ala
 420 425 430
 Val Arg Val Thr Ser Glu Asp Pro Asp Asp Gly Phe Lys Pro Thr Ser
 435 440 445
 Gly Arg Val Glu Glu Leu Ser Phe Lys Ser Lys Pro Asn Val Trp Ala
 450 455 460
 Tyr Phe Ser Val Lys Ser Gly Gly Gly Ile His Glu Phe Ser Asp Ser
 465 470 475 480
 Glu Phe Gly His Val Phe Ala Phe Gly Glu Ser Arg Ala Leu Ala Ile

(24)

特開平7-143887

45
 485 490 495
 Ala Asn Met Val Leu Gly Leu Lys Glu Ile Glu Ile Arg Gly Glu Ile
 500 505 510
 Arg Thr Asn Val Asp Tyr Thr Ile Asp Leu Leu His Ala Ser Asp Tyr
 515 520 525
 Arg Asp Asn Lys Ile His Thr Gly Trp Leu Asp Ser Arg Ile Ala Met
 530 535 540
 Arg Val Arg Ala Glu Arg Pro Pro Trp Tyr Leu Ser Val Val Gly Gly
 545 550 555 560
 Ala Leu Tyr Lys Ala Ser Ala Thr Ser Ala Ala Val Val Ser Asp Tyr
 565 570 575
 Val Gly Tyr Leu Glu Lys Gly Glu Ile Pro Pro Lys His Ile Ser Leu
 580 585 590
 Val His Ser Glu Val Ser Leu Asn Ile Glu Gly Ser Lys Tyr Thr Ile
 595 600 605
 Asp Val Val Arg Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Arg Leu Arg Met Asn Lys
 610 615 620
 Ser Glu Val Val Ala Glu Ile His Thr Leu Arg Asp Gly Gly Leu Leu
 625 630 635 640
 Met Glu Leu Asp Gly Lys Ser His Val Ile Tyr Ala Glu Glu Glu Ala
 645 650 655
 Ala Gly Thr Arg Leu Leu Ile Asp Gly Arg Thr Cys Leu Leu Glu Asn
 660 665 670
 Asp His Asp Pro Ser Lys Leu Met Ala Glu Thr Pro Cys Lys Leu Met
 675 680 685
 Arg Tyr Leu Ile Ser Asp Asn Ser Asn Ile Asp Ala Asp Thr Pro Tyr
 690 695 700
 Ala Glu Val Glu Val Met Lys Met Cys Met Pro Leu Leu Ser Pro Ala
 705 710 715 720
 Ser Gly Val Ile His Phe Lys Met Ser Glu Gly Glu Ala Met Glu Ala
 725 730 735
 Gly Glu Leu Ile Ala Asn Leu Asp Leu Asp Asp Pro Ser Ala Val Arg
 740 745 750
 Lys Ala Glu Pro Phe His Gly Ser Phe Pro Arg Leu Gly Leu Pro Thr
 755 760 765
 Ala Ile Ser Gly Arg Val His Glu Arg Cys Ala Ala Thr Leu Asn Ala
 770 775 780
 Ala Arg Met Ile Leu Ala Gly Tyr Glu His Lys Val Asp Glu Val Val
 785 790 795 800
 Glu Asp Leu Leu Asn Cys Leu Asp Ser Pro Glu Leu Pro Phe Leu Glu
 805 810 815
 Trp Glu Glu Cys Phe Ala Val Leu Ala Thr Arg Leu Pro Lys Asn Leu
 820 825 830
 Arg Asn Met Leu Glu Ser Lys Tyr Arg Glu Phe Glu Ser Ile Ser Arg
 835 840 845
 Asn Ser Leu Thr Thr Asp Phe Pro Ala Lys Leu Leu Lys Gly Ile Leu
 850 855 860
 Glu Ala His Leu Ser Ser Cys Asp Glu Lys Glu Arg Gly Ala Leu Glu
 865 870 875 880
 Arg Leu Ile Glu Pro Leu Met Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Glu Gly Gly

(25)

特開平7-143887

47 885 890 895 48

Arg Glu Ser His Ala Arg Val Ile Val His Ser Leu Phe Glu Glu Tyr
900 905 910

Leu Ser Val Glu Glu Leu Phe Asn Asp Asn Met Leu Ala Asp Val Ile
915 920 925

Glu Arg Met Arg Gln Leu Tyr Lys Lys Asp Leu Leu Lys Ile Val Asp
930 935 940

Ile Val Leu Ser His Gln Gly Ile Lys Asn Lys Asn Lys Leu Val Leu
945 950 955 960

Arg Leu Met Glu Gln Leu Val Tyr Pro Asn Pro Ala Ala Tyr Arg Asp
965 970 975

Lys Leu Ile Arg Phe Ser Thr Leu Asn His Thr Asn Tyr Ser Glu Leu
980 985 990

Ala Leu Lys Ala Ser Gln Leu Leu Glu Gln Thr Lys Leu Ser Glu Leu
995 1000 1005

Arg Ser Asn Ile Ala Arg Ser Leu Ser Glu Leu Glu Met Phe Thr Glu
1010 1015 1020

Asp Gly Glu Asn Met Asp Thr Pro Lys Arg Lys Ser Ala Ile Asn Glu
1025 1030 1035 1040

Arg Ile Glu Asp Leu Val Ser Ala Ser Leu Ala Val Glu Asp Ala Leu
1045 1050 1055

Val Gly Leu Phe Asp His Ser Asp His Thr Leu Gln Arg Arg Val Val
1060 1065 1070

Glu Thr Tyr Ile Arg Arg Leu Tyr Gln Pro Tyr Val Val Lys Asp Ser
1075 1080 1085

Val Arg Met Glu Trp His Arg Ser Gly Leu Leu Ala Ser Trp Glu Phe
1090 1095 1100

Leu Glu Glu His Met Glu Arg Lys Asn Ile Gly Leu Asp Asp Pro Asp
1105 1110 1115 1120

Thr Ser Glu Lys Gly Leu Val Glu Lys Arg Ser Lys Arg Lys Trp Gly
1125 1130 1135

Ala Met Val Ile Ile Lys Ser Leu Gln Phe Leu Pro Ser Ile Ile Ser
1140 1145 1150

Ala Ala Leu Arg Glu Thr Lys His Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Gly Ala
1155 1160 1165

Pro Leu Ser Gly Asn Met Met His Ile Ala Ile Val Gly Ile Asn Asn
1170 1175 1180

Gln Met Ser Leu Leu Glu Asp Ser Gly Asp Glu Asp Gln Ala Gln Glu
1185 1190 1195 1200

Arg Val Asn Lys Leu Ala Lys Ile Leu Lys Glu Glu Glu Val Ser Ser
1205 1210 1215

Ser Leu Cys Ser Ala Gly Val Gly Val Ile Ser Cys Ile Ile Gln Arg
1220 1225 1230

Asp Glu Gly Arg Thr Pro Met Arg His Ser Phe His Trp Ser Leu Glu
1235 1240 1245

Lys Gln Tyr Tyr Val Glu Glu Pro Leu Leu Arg His Leu Glu Pro Pro
1250 1255 1260

Leu Ser Ile Tyr Leu Glu Leu Asp Lys Leu Lys Gly Tyr Ser Asn Ile
1265 1270 1275 1280

Glu Tyr Thr Pro Ser Arg Asp Arg Gln Trp His Leu Tyr Thr Val Thr

Scanned 12/10/2004

(26)

特開平7-143887

49 1285 1290 1295 50

Asp Lys Pro Val Pro Ile Lys Arg Met Phe Leu Arg Ser Leu Val Arg
1300 1305 1310

Glu Ala Thr Met Asn Asp Gly Phe Ile Leu Glu Glu Gly Glu Asp Lys
1315 1320 1325

Glu Leu Ser Glu Thr Leu Ile Ser Met Ala Phe Thr Ser Lys Cys Val
1330 1335 1340

Leu Arg Ser Leu Met Asp Ala Met Glu Glu Leu Glu Leu Asn Ala His
1345 1350 1355 1360

Asn Ala Ala Met Lys Pro Asp His Ala His Met Phe Leu Cys Ile Leu
1365 1370 1375

Arg Glu Glu Glu Ile Asp Asp Leu Val Pro Phe Pro Arg Arg Val Glu
1380 1385 1390

Val Asn Ala Glu Asp Glu Glu Thr Thr Val Glu Met Ile Leu Glu Glu
1395 1400 1405

Ala Ala Arg Glu Ile His Arg Ser Val Gly Val Arg Met His Arg Leu
1410 1415 1420

Gly Val Cys Glu Trp Glu Val Arg Leu Trp Leu Val Ser Ser Gly Leu
1425 1430 1435 1440

Ala Cys Gly Ala Trp Arg Val Val Val Ala Asn Val Thr Gly Arg Thr
1445 1450 1455

Cys Thr Val His Ile Tyr Arg Glu Val Glu Thr Pro Gly Arg Asn Ser
1460 1465 1470

Leu Ile Tyr His Ser Ile Thr Lys Lys Gly Pro Leu His Glu Thr Pro
1475 1480 1485

Ile Ser Asp Glu Tyr Lys Pro Leu Gly Tyr Leu Asp Arg Glu Arg Leu
1490 1495 1500

Ala Ala Arg Arg Ser Asn Thr Thr Tyr Cys Tyr Asp Phe Pro Leu Ala
1505 1510 1515 1520

Phe Gly Thr Ala Leu Glu Leu Leu Trp Ala Ser Glu His Pro Gly Val
1525 1530 1535

Lys Lys Pro Tyr Lys Asp Thr Leu Ile Asn Val Lys Glu Leu Val Phe
1540 1545 1550

Ser Lys Pro Glu Gly Ser Ser Gly Thr Ser Leu Asp Leu Val Glu Arg
1555 1560 1565

Pro Pro Gly Leu Asn Asp Phe Gly Met Val Ala Trp Cys Leu Asp Met
1570 1575 1580

Ser Thr Pro Glu Phe Pro Met Gly Arg Lys Leu Leu Val Ile Ala Asn
1585 1590 1595 1600

Asp Val Thr Phe Lys Ala Gly Ser Phe Gly Pro Arg Glu Asp Ala Phe
1605 1610 1615

Phe Leu Ala Val Thr Glu Leu Ala Cys Ala Lys Lys Leu Pro Leu Ile
1620 1625 1630

Tyr Leu Ala Ala Asn Ser Gly Ala Arg Leu Gly Val Ala Glu Glu Val
1635 1640 1645

Lys Ala Cys Phe Lys Val Gly Trp Ser Asp Glu Ile Ser Pro Glu Asn
1650 1655 1660

Gly Phe Glu Tyr Ile Tyr Leu Ser Pro Glu Asp His Glu Arg Ile Gly
1665 1670 1675 1680

Ser Ser Val Ile Ala His Glu Val Lys Leu Ser Ser Gly Glu Thr Arg

(27)

特開平7-143887

51
 1685 1690 1695
 Trp Val Ile Asp Thr Ile Val Gly Lys Glu Asp Gly Ile Gly Val Glu
 1700 1705 1710
 Asn Leu Thr Gly Ser Gly Ala Ile Ala Gly Ala Tyr Ser Lys Ala Tyr
 1715 1720 1725
 Asn Glu Thr Phe Thr Leu Thr Phe Val Ser Gly Arg Thr Val Gly Ile
 1730 1735 1740
 Gly Ala Tyr Leu Ala Arg Leu Gly Met Arg Cys Ile Gln Arg Leu Asp
 1745 1750 1755 1760
 Gln Pro Ile Ile Leu Thr Gly Phe Ser Thr Leu Asn Lys Leu Leu Gly
 1765 1770 1775
 Arg Glu Val Tyr Ser Ser His Met Glu Leu Gly Gly Pro Lys Ile Met
 1780 1785 1790
 Gly Thr Asn Gly Val Val His Leu Thr Val Ser Asp Asp Leu Glu Gly
 1795 1800 1805
 Val Ser Ala Ile Leu Asn Trp Leu Ser Tyr Ile Pro Ala Tyr Val Gly
 1810 1815 1820
 Gly Pro Leu Pro Val Leu Ala Pro Leu Asp Pro Pro Glu Arg Ile Val
 1825 1830 1835 1840
 Glu Tyr Val Pro Glu Asn Ser Cys Asp Pro Arg Ala Ala Ile Ala Gly
 1845 1850 1855
 Val Lys Asp Asn Thr Gly Lys Trp Leu Gly Gly Ile Phe Asp Lys Asn
 1860 1865 1870
 Ser Phe Ile Gln Thr Leu Glu Gly Trp Ala Arg Thr Val Val Thr Gly
 1875 1880 1885
 Arg Ala Lys Leu Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Val Ala Val Glu Thr
 1890 1895 1900
 Glu Thr Val Met Glu Ile Ile Pro Ala Asp Pro Gly Gln Leu Asp Ser
 1905 1910 1915 1920
 His Glu Arg Val Val Pro Gln Ala Gly Gln Val Trp Phe Pro Asp Ser
 1925 1930 1935
 Ala Ala Lys Thr Ala Gln Ala Leu Met Asp Phe Asn Arg Glu Glu Leu
 1940 1945 1950
 Pro Leu Phe Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly Gly Gln Arg
 1955 1960 1965
 Asp Leu Phe Glu Gly Ile Leu Gln Ala Gly Ser Thr Ile Val Glu Asn
 1970 1975 1980
 Leu Arg Thr Tyr Arg Glu Pro Val Phe Val Tyr Ile Pro Met Met Gly
 1985 1990 1995 2000
 Glu Leu Arg Gly Gly Ala Trp Val Val Val Asp Ser Gln Ile Asn Ser
 2005 2010 2015
 Asp Tyr Val Glu Met Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Arg Gly Asn Val Leu
 2020 2025 2030
 Glu Pro Glu Gly Thr Ile Glu Ile Lys Phe Arg Thr Lys Glu Leu Leu
 2035 2040 2045
 Glu Cys Met Gly Arg Leu Asp Glu Lys Leu Ile Ser Leu Lys Ala Lys
 2050 2055 2060
 Leu Gln Asp Ala Lys Gln Ser Glu Ala Tyr Ala Asn Ile Glu Leu Leu
 2065 2070 2075 2080
 Gln Gln Gln Ile Lys Ala Arg Glu Lys Gln Leu Leu Pro Val Tyr Ile

(28)

特開平7-143887

53 2085 2090 2095 54

Gln Ile Ala Thr Lys Phe Ala Glu Leu His Asp Thr Ser Met Arg Met
2100 2105 2110

Ala Ala Lys Gly Val Ile Lys Ser Val Val Glu Trp Ser Gly Ser Arg
2115 2120 2125

Ser Phe Phe Tyr Lys Lys Leu Asn Arg Arg Ile Ala Glu Ser Ser Leu
2130 2135 2140

Val Lys Asn Val Arg Glu Ala Ser Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Lys Ser
2145 2150 2155 2160

Ser Met Arg Leu Ile Gln Asp Trp Phe Cys Asn Ser Asp Ile Ala Lys
2165 2170 2175

Gly Lys Glu Glu Ala Trp Thr Asp Asp Gln Val Phe Phe Thr Trp Lys
2180 2185 2190

Asp Asn Val Ser Asn Tyr Glu Leu Lys Leu Ser Glu Leu Arg Ala Glu
2195 2200 2205

Lys Leu Leu Asn Glu Leu Ala Glu Ile Gly Asn Ser Ser Asp Leu Glu
2210 2215 2220

Ala Leu Pro Glu Gly Leu Ala Asn Leu Leu Asn Lys Val Glu Pro Ser
2225 2230 2235 2240

Lys Arg Glu Glu Leu Val Ala Ala Ile Arg Lys Val Leu Gly
2245 2250 2254

【0109】

【図面の簡単な説明】

【図1】 各種生物由来のACCCaseのピオチンカルボキシラーゼ・ドメインの間で類似性の認められる領域のアミノ酸配列の比較を示す。

【図2】 シロイヌナズナACCCase遺伝子(ACCCase-1, ACCCase-2, ACCCase-3)のゲノムクローンの物理的地図。

【図3】 ACCCaseのピオチンカルボキシルキリアープロテイン・ドメインにおけるアミノ酸配列「BCCP」の生物間での比較を示す。

【図4】 シロイヌナズナのACCCase-1遺伝子の一部に由来する927bpの増幅断片をプローブとするシロイヌナズナのコロンビア株(C)ならびにランズバーク株(L)のゲノムDNAとのサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図。

【図5】 シロイヌナズナの第1染色体のRFLP地図とACCCase-1遺伝子の座位を示す図。

【図6】 アブラナのACCCase遺伝子を含むゲノムクローンの物理的地図。

【図7】 センス・ACCCase遺伝子発現ベクターの構築を示す図。

【図8】 アンチセンス・ACCCase遺伝子発現ベクターの構築を示す図。

【図9】 シロイヌナズナACCCaseのcDNAクローンの物理的地図。

【図10】 センス・ACCCase遺伝子発現ベクターの構築を示す図。

【符号の説明】

図4において、図中の「M」は、DNA分子重量マーカーを示している。

【図3】

(BCCP)

ラット TGGGlu Val Met Lys Met Val
ニットU TGGGlu Val Met Lys Met Val
鶏卵 TGGGlu Val Met Lys Met Glu
大腸菌 TGGGlu Ala Met Lys Met Met

(29)

特開平7-143887

【図1】

【a】
 ラット ¹²⁵I-Tyr Pro Val Met Ile Lys Ala
 ニワトリ ¹²⁵I-Tyr Pro Val Met Ile Lys Ala
 豚 ¹²⁵I-Phe Pro Val Met Ile Lys Ala
 大腸菌 ¹²⁵I-Tyr Pro Val Ile Ile Lys Ala

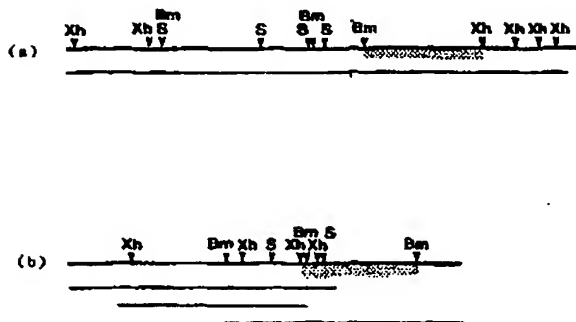
【b】
 ラット ¹²⁵I-His Gln Lys Ile Ile Glu Glu Ala
 ニワトリ ¹²⁵I-His Gln Lys Ile Ile Glu Glu Ala
 豚 ¹²⁵I-His Gln Lys Ile Ile Glu Glu Ala
 大腸菌 ¹²⁵I-His Gln Lys Val Val Glu Glu Ala

【c】
 ラット ¹²⁵I-Glu His Pro Cys Thr Glu Met
 ニワトリ ¹²⁵I-Glu His Pro Cys Thr Glu Met
 豚 ¹²⁵I-Glu His Pro Thr Thr Glu Met
 大腸菌 ¹²⁵I-Glu His Pro Val Thr Glu Met

【図4】



【図6】



(8) ACCase-1

$\text{Bq} \quad \text{Bg} \quad \text{BgD} \quad \text{Hd} \quad \text{HdX} \quad \text{Ev} \quad \text{Bg}^{\text{Ben}} \quad \text{Kp} \quad \text{Pg} \quad \text{Bg} \quad \text{BgE} \quad \text{BgH} \quad \text{Bg} \quad \text{Md} \quad \text{Ev}$

5

ks

(b) ACCase-2

[illegible]

(c) ACCase-3

PAGE

14

(30)

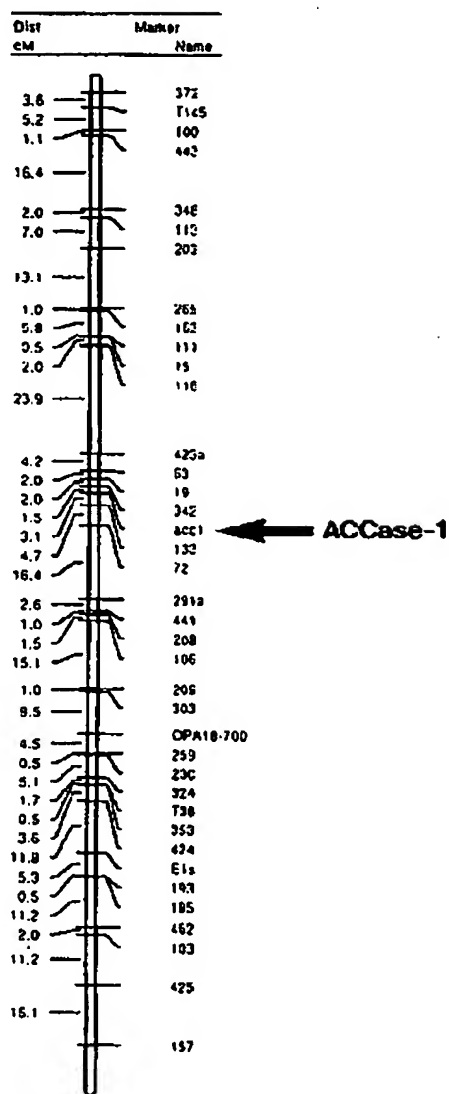
特開平7-143887

【圖2】

(31)

特開平7-143887

【図5】

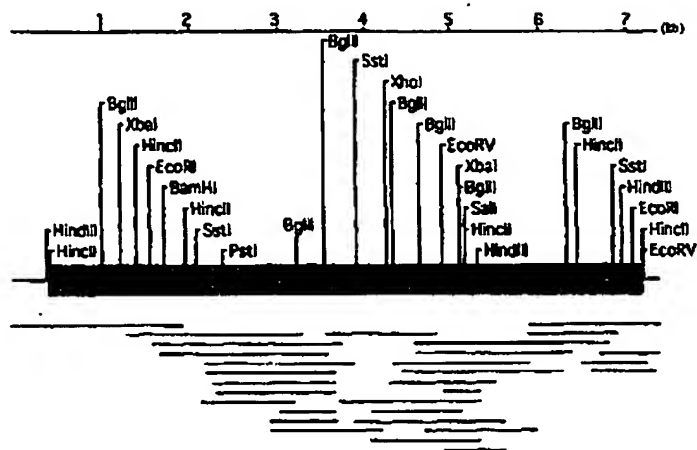


Scanned 12/10/2004

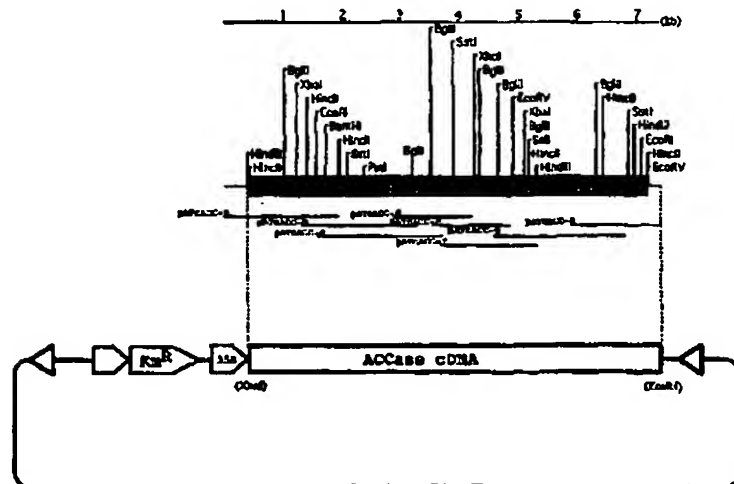
(33)

特開平7-143887

【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C12N 9/00

識別記号

序内整理番号

9359-4B

F1

技術表示箇所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.